



**XUNTA DE GALICIA**  
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL  
E DO MAR  
Centro de Investigacións Agrarias de Mabegondo



**INGACAL**  
INSTITUTO GALEGO  
DA CRUZADA ALIMENTARIA

**XUNTA DE GALICIA-INGACAL**  
**CENTRO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS DE MABEGONDO**  
**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL**  
**LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA**



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**  
**LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA**

**Contribución de los animales domésticos y silvestres a la contaminación de aguas  
superficiales por *Cryptosporidium* y *Giardia***

**MEMORIA** que para optar al Grado de Doctor por la  
Universidad de Santiago de Compostela presenta

**Ignacio García Presedo**

**Santiago de Compostela, 2012**





*A mi familia*



## ***Agradecimientos***

En primer lugar, quisiera expresar mi agradecimiento a la Dra. Dña. M<sup>a</sup> Elvira Ares Mazás y al Dr. D. José Antonio Castro Hermida por la tutoría y dirección de esta Tesis Doctoral, por compartir sus conocimientos científicos y por la confianza depositada en mí. Asimismo, agradezco todos los consejos y dedicación recibidos.

Deseo expresar, también, mi gratitud a todas aquellas personas e instituciones que de forma directa o indirecta han hecho posible la realización de este trabajo, en especial:

A las Dras. Dña. Mercedes Mezo Menéndez y Dña. Marta González Warleta del Laboratorio de Parasitología del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM), por el gran apoyo y confianza que siempre he recibido de su parte, así como por su inestimable orientación y colaboración en los distintos estudios realizados.

A los Drs. D. José Manuel Correia da Costa y D. André Almeida del *Centro de Estudos de Ciência Animal, Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares, Universidade do Porto* (Portugal).

Al personal responsable y operarios de las estaciones de tratamiento de agua potable, de depuración de agua residual y de las redes de alcantarillado de los distintos municipios, por las facilidades y amabilidad proporcionadas para la realización de los diferentes estudios.

A los Señores propietarios y demás personal de las granjas; cazadores y veterinarios del Servicio de Sanidad Animal de la Xunta de Galicia, por su disponibilidad y cooperación en la tarea de recogida de muestras, tan necesarios para la consecución de los trabajos.

A Dña. M<sup>a</sup> Carmen Carro Corral y D. Xabier Cortizo Mella, compañeros del Laboratorio de Parasitología del CIAM, por su buena disposición y por hacer más agradable la convivencia diaria.

A los Profs. Drs. D. Luis Miguel Ortega Mora, Dña. Mercedes Gómez Bautista y Dña. Susana Pedraza Díaz del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, así como al resto de los integrantes del grupo SALUVET, por la amable acogida en su Laboratorio en el que tuve la oportunidad de realizar una estancia muy grata y de mucho provecho.

Deseo agradecer de forma general, y así evitar olvidos inexcusables, a todos los investigadores y compañeros del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, sus muchas enseñanzas, buena disponibilidad y por su agradable compañía. En especial a Iciar, Andrés, Cris, Ángel, Belén y Antonio.

A Sonia, por su inagotable paciencia, apoyo y comprensión así como por sus buenos consejos esenciales para mí en la realización de esta Tesis Doctoral.

A M<sup>a</sup> Carmen I., Zalo, Sandra y Choli por su valiosa ayuda tanto en temas informáticos como en la aportación de información sobre las cuencas hidrográficas gallegas.

A mis amigos Xela, Nico, Mar, Berto M., Pili, Paula, Ana Belén, Arancha, María B., Begoña, Berto, Nando, Rocío, Patricia, Sergio, Iván, Inés, Pili C., y Pablo por los buenos ratos que me hicieron pasar.

Por último, quisiera dar las gracias a mi familia, por su apoyo incondicional.

Esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente financiada por un Proyecto de Investigación subvencionado por la Xunta de Galicia a través de la Consellería de Economía e Industria (10PXIB503055PR) y por dos del Ministerio de Economía y Competitividad a través del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (RTA2006-00007-00-00; RTA2010-00003-00-00):

- **Importancia del agua en la transmisión de dos zoonosis parasitarias –cryptosporidiosis y giardiosis– en Galicia** (10PXIB503055PR).
- **Epidemiología de la cryptosporidiosis y la giardiosis en rumiantes domésticos en Galicia** (RTA2006-00007-00-00).
- **Detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* en aguas –superficiales, potables, residuales y regeneradas– de Galicia. Evaluación del riesgo en sanidad animal y humana** (RTA2010-00003-00-00).



## ÍNDICE

PRESENTACIÓN COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES.....	1
AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR Y DE LA TUTORA.....	5
CERTIFICACIÓN DE LA SECRETARÍA DEL DEPARTAMENTO.....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
1. CRYPTOSPORIDIOSIS Y GIARDIOSIS.....	15
<b>1.1. Etiología.....</b>	15
1.1.1. Especies y genotipos de <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> .....	17
1.1.2. Biología de <i>Cryptosporidium</i> spp. y <i>Giardia</i> spp.....	22
2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	26
<b>2.1. Importancia de la cryptosporidiosis y de la giardiosis.....</b>	26
2.1.1. En animales domésticos y silvestres.....	28
2.1.2. En el hombre.....	34
<b>2.2. Mecanismos de transmisión.....</b>	41
2.2.1. El agua como vehículo de transmisión.....	44
2.2.2. Importancia de los animales en la contaminación del agua.....	47
<b>2.3. Resistencia de las formas infectantes.....</b>	51
2.3.1. Sistemas de tratamiento de agua potable.....	54
2.3.2. Sistemas de depuración de agua residual.....	62
PRESENTACIÓN DE LAS PUBLICACIONES.....	71
1. PREVALENCIA DE LA CRYPTOSPORIDIOSIS Y DE LA GIARDIOSIS EN ANIMALES DOMÉSTICOS Y SILVESTRES: CONTRIBUCIÓN A LA CONTAMINACIÓN DE AGUAS SUPERFICIALES.....	75
<b>1.1. <i>Cryptosporidium</i> spp. and <i>Giardia duodenalis</i> in two areas of Galicia (NW Spain). 2011. <i>Science of the Total Environment</i>, 409: 2451-2459.....</b>	75
<b>1.2. Prevalence of <i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia</i> in roe deer (<i>Capreolus capreolus</i>) and wild boars (<i>Sus scrofa</i>) in Galicia (NW, Spain). 2011. <i>Veterinary Parasitology</i>, 179: 216-219.....</b>	76
<b>1.3. Detection of <i>Cryptosporidium</i> spp. and <i>Giardia duodenalis</i> in surface water: A health risk for humans and animals. 2009. <i>Water Research</i>, 43: 4133-4142.....</b>	77
2. CONTAMINACIÓN DEL AGUA CON FORMAS INFECTANTES DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. Y <i>GIARDIA DUODENALIS</i> . RIESGO EN SANIDAD ANIMAL Y EN SALUD PÚBLICA.....	78
<b>2.1. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with <i>Cryptosporidium</i> spp. and <i>Giardia duodenalis</i>. 2008. <i>Water Research</i>, 42: 3528-3538.....</b>	78

2.2. Presence of <i>Cryptosporidium</i> spp. and <i>Giardia duodenalis</i> through drinking water. 2008. <i>Science of the Total Environment</i> , 405: 45-53.....	80
2.3. <i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia</i> detection in water bodies of Galicia, Spain. 2010. <i>Water Research</i> , 44: 5887-5896.....	81
UNIDAD TEMÁTICA DE LAS PUBLICACIONES.....	83
RESUMEN Y COPIA DE LAS PUBLICACIONES.....	89
DISCUSIÓN.....	171
CONCLUSIONES.....	199
BIBLIOGRAFÍA.....	203
APÉNDICE.....	249
1. ÍNDICE DE IMPACTO Y CATEGORÍAS TEMÁTICAS DE LAS PUBLICACIONES.....	251
2. CONTRIBUCIÓN DEL DOCTORANDO.....	283
3. DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES DE LOS COAUTORES.....	287



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADWG</b>	Australian Drinking Water Guidelines
<b>ARF</b>	Área recreativa fluvial
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal
<b>AWWA</b>	American Water Works Association
<b>BOE</b>	Boletín Oficial del Estado
<b>BOJA</b>	Boletín Oficial de la Junta de Andalucía
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DBO<sub>5</sub></b>	Demanda bioquímica de oxígeno transcurridos 5 días de reacción
<b>DOG</b>	Diario Oficial de Galicia
<b>DWI</b>	Drinking Water Inspectorate
<b>ECDC</b>	European Centre for Disease Prevention and Control
<b>EDAR</b>	Estación depuradora de agua residual
<b>EEES</b>	Espacio Europeo de Educación Superior
<b>ERAR</b>	Estación regeneradora de agua residual
<b>ETAP</b>	Estación de tratamiento de agua potable
<b>HAART</b>	Terapia antirretroviral altamente activa
<b>ICZN</b>	Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica
<b>IFD</b>	Inmunofluorescencia directa
<b>IMS</b>	Separación inmunomagnética
<b>IP</b>	Ioduro de propidio
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>(oo)quistes</b>	Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp. y quistes de <i>Giardia</i> spp.
<b>OPL</b>	Ooquistes por litro
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>QPL</b>	Quistes por litro
<b>SIDA</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>UNF</b>	Unidades nefelométricas
<b>USEPA</b>	United States Environmental Protection Agency
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>vs</b>	Versus



**PRESENTACIÓN COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES**



En el actual contexto universitario, regido por la nueva normativa que ha ido surgiendo desde el año 2007 publicada tanto en el RD 1393/2007 (BOE, núm. 260, de 30 de octubre de 2007; derogado en 2011 y aplicable hasta 2017) como en el RD 99/2011 (BOE, núm. 35, de 10 de febrero de 2011) y que busca la convergencia con las universidades del Espacio Europeo de Educación Superior (EEES), la calidad de la formación así como de los resultados de la misma adquiere un papel relevante. Este nuevo marco legal incluye modificaciones en el desarrollo, elaboración y presentación del trabajo de Tesis Doctoral que tradicionalmente en las universidades españolas se muestra bajo un formato rígido e inamovible. Incluso, actualmente se promueve un modelo de formación doctoral con base en la Universidad pero integradora de la colaboración de otros organismos, entidades e instituciones implicadas en la I+D+i tanto nacional como internacional. Por tanto, se introduce la necesidad de realizar cambios en la reglamentación de las universidades españolas con el fin de aceptar modelos europeos de Tesis Doctoral. De hecho, bajo los estímulos y parámetros del EEES y teniendo en cuenta que las universidades deben establecer el procedimiento para la presentación de la Tesis Doctoral, diversas Instituciones españolas ya han elaborado nuevos reglamentos relativos a la realización, tramitación y evaluación de las Tesis Doctorales, elemento fundamental en la culminación de la carrera universitaria y en el avance del conocimiento científico que es una función inherente a la Universidad.

En este sentido, en diversos ámbitos del conocimiento sucede con frecuencia que el material que integra una Tesis Doctoral se ha ido publicando durante la realización de la misma en revistas científicas especializadas y de prestigio. Esta circunstancia constituye una prueba externa del reconocimiento de la tarea que se está desarrollando. Además, sirve como criterio de calidad para el tribunal que tiene que valorar la Tesis Doctoral en el momento de su presentación y defensa. En consecuencia, se está instaurando una modalidad de Tesis Doctoral consistente en el compendio de artículos publicados en revistas especializadas y reconocidas internacionalmente, como resultado de la actividad investigadora desarrollada y la formación adquirida del doctorando. Esta práctica en ciertos países europeos es comúnmente aceptada y en España es cada vez más habitual.

De conformidad con el Reglamento de la Universidad de Santiago de Compostela que regula la realización, tramitación y evaluación de las Tesis Doctorales hemos optado por presentar esta memoria de Tesis Doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones. Los seis artículos presentados constituyen una unidad temática ya que todos ellos están coordinados con la finalidad, de avanzar en el conocimiento epidemiológico y molecular de dos enfermedades parasitarias de importancia en sanidad animal y humana. Para dar un mejor entendimiento a los estudios realizados, los trabajos publicados se han dividido en dos grupos.

La referencia completa de los artículos que constituyen el cuerpo de la Tesis Doctoral, clasificados en dos secciones, se indica a continuación:

1. PREVALENCIA DE LA CRYPTOSPORIDIOSIS Y DE LA GIARDIOSIS EN ANIMALES DOMÉSTICOS Y SILVESTRES: CONTRIBUCIÓN A LA CONTAMINACIÓN DE AGUAS SUPERFICIALES.

1.1. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain). José Antonio Castro-Hermida, Ignacio García-Presedo, André Almeida, Marta González-Warleta, José Manuel Correia da Costa, Mercedes Mezo. *Science of the Total Environment*, 409 (2011) 2451-2459.

1.2. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Galicia (NW, Spain). José Antonio Castro-Hermida, Ignacio García-Presedo, Marta González-Warleta, Mercedes Mezo. *Veterinary Parasitology*, 179 (2011) 216-219.

1.3. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals. José Antonio Castro-Hermida, Ignacio García-Presedo, André Almeida, Marta González-Warleta, José Manuel Correia da Costa, Mercedes Mezo. *Water Research*, 43 (2009) 4133-4142.

2. CONTAMINACIÓN DEL AGUA CON FORMAS INFECTANTES DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. Y *GIARDIA DUODENALIS*. RIESGO EN SANIDAD ANIMAL Y EN SALUD PÚBLICA.

2.1. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. José Antonio Castro-Hermida, Ignacio García-Presedo, André Almeida, Marta González-Warleta, José Manuel Correia da Costa, Mercedes Mezo. *Water Research*, 42 (2008) 3528-3538.

2.2. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water. José Antonio Castro-Hermida, Ignacio García-Presedo, André Almeida, Marta González-Warleta, José Manuel Correia da Costa, Mercedes Mezo. *Science of the Total Environment*, 405 (2008) 45-53.

2.3. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. José Antonio Castro-Hermida, Ignacio García-Presedo, Marta González-Warleta, Mercedes Mezo. *Water Research*, 44 (2010) 5887-5896.

Todos los artículos presentados en esta memoria de Tesis Doctoral han sido publicados en revistas cuyo índice de impacto está incluido en la relación de revistas del *Journal of Citation Reports®*.

**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR Y DE LA TUTORA**







José Antonio Castro Hermida, Investigador Titular del Laboratorio de Parasitología del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo perteneciente al Instituto Galego da Calidade Alimentaria de la Xunta de Galicia y M<sup>a</sup> Elvira Ares Mazás, Catedrática de Parasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela, en calidad de Director y Tutora, respectivamente, del trabajo de Tesis Doctoral titulado **“Contribución de los animales domésticos y silvestres a la contaminación de aguas superficiales por *Cryptosporidium* y *Giardia*”**,

#### **AUTORIZAN:**

Al Licenciado en Biología D. Ignacio García Presedo a presentar la memoria de Tesis Doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones. Los seis artículos que constituyen el trabajo de Tesis Doctoral se han publicado en tres revistas científicas –*Water Research*, *Science of the Total Environment* y *Veterinary Parasitology*– de reconocido prestigio internacional y amplia difusión académica. Estas revistas están recogidas en la base de datos *Journal of Citation Reports*® e incluidas en el primer cuartil de varias categorías temáticas, por lo que alcanzan un alto índice de impacto.

En Santiago de Compostela, a 11 de junio de 2012

Fdo. José Antonio Castro Hermida

Fdo. M<sup>a</sup> Elvira Ares Mazás



**CERTIFICACIÓN DE LA SECRETARÍA DEL DEPARTAMENTO**





Fernanda Romarís Martínez, Profesora Titular de Parasitología y Secretaria del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela,

**CERTIFICA:**

Que el trabajo de investigación titulado “**Contribución de los animales domésticos y silvestres a la contaminación de aguas superficiales por *Cryptosporidium* y *Giardia***”, que presenta el Licenciado en Biología D. Ignacio García Presedo para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela, se ha desarrollado en el Programa de Doctorado “Avances en Biología Microbiana e Parasitaria” de este Departamento, bajo la dirección del Dr. D. José Antonio Castro Hermida, Investigador Titular del INGACAL-CIAM y la tutoría de la Prof. Dra. Dña. M<sup>a</sup> Elvira Ares Mazás, Catedrática de la USC.

Y para que así conste y a los efectos oportunos expido el presente certificado en Santiago de Compostela, a 11 de junio de 2012.

Fdo. Fernanda Romarís Martínez



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA





## 1. CRYPTOSPORIDIOSIS Y GIARDIOSIS

### 1.1. Etiología

La cryptosporidiosis y la giardiosis son enfermedades parasitarias de distribución mundial, producidas por protozoos incluidos en los géneros *Cryptosporidium* y *Giardia*, que afectan a un amplio rango de hospedadores. Algunas especies o genotipos presentan, además, características zoonóticas, por lo que tienen gran importancia sanitaria. Ambas enfermedades ocasionan un síndrome de mal absorción y diarrea que se manifiesta principalmente en hospedadores jóvenes y en individuos inmunocomprometidos.

En el año 1907, Ernest Edward Tyzzer describió una especie cuyo desarrollo tiene lugar en las glándulas gástricas de ratones y a la que denominó *Cryptosporidium muris*, aportando más tarde datos de su ciclo biológico completo (Tyzzer, 1910). El mismo autor describió los ooquistes y la biología de otra especie de menor tamaño, esta vez ubicada en el intestino delgado y a la que nombró *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer, 1912). Sin embargo, el género *Cryptosporidium* no tuvo mucha importancia hasta que Slavin (1955) describió una nueva especie, *Cryptosporidium meleagridis*, que provocaba diarrea severa con mortalidad baja en pavos. Desde entonces, hubo una continua evolución en la determinación de especies y rango de hospedadores. Diversas especies fueron denominadas simplemente al ser encontradas en un nuevo hospedador, en el cual *Cryptosporidium* no había sido descrito previamente. Desde el momento en que ciertas especies de *Cryptosporidium* se reconocieron como agentes patógenos para el ganado (Panciera y col., 1971) y el hombre (Meisel y col., 1976; Nime y col., 1976), adquirieron una mayor importancia y se incrementaron los estudios de transmisión utilizando aislados ooquisticos de procedencia humana a hospedadores animales. De esta forma, se comprobó que aislados morfológicamente indistinguibles pudieron ser transmitidos entre dos o más especies de hospedadores. Como consecuencia de estos hallazgos, algunos investigadores sugirieron que el género *Cryptosporidium* podría ser monoespecífico (Tzipori y col., 1980a).

Sin embargo, estudios posteriores de transmisión cruzada junto con aportaciones moleculares invalidaron esta hipótesis. De hecho, en la actualidad, la caracterización molecular de aislados de *Cryptosporidium* ha permitido clarificar la confusa taxonomía de las especies de este género y validar la existencia de diferentes especies en cada clase de hospedador. Nuevas especies de *Cryptosporidium* han sido denominadas basándose en diferentes parámetros que incluyen no solo los datos morfológicos sino también los aspectos biológicos, la especificidad por el hospedador, las consecuencias histopatológicas y las particularidades moleculares.

Por otra parte, la primera descripción del enteropatógeno flagelado *Giardia* fue realizada en el año 1681 por Antonie van Leeuwenhoek que lo observó durante el examen microscópico de sus propias heces, aunque no fue hasta el año 1859 cuando Wilhelm Lambl, a partir de una muestra fecal de un niño, describe con más detalle este protozoo, incluyendo al parásito dentro del género *Cercomonas* y lo designó *C. intestinalis* (Lambl, 1859). A finales del siglo XIX, Kunstler identificó en renacuajos un parásito con características microscópicas semejantes y lo denominó *Giardia agilis* (Kunstler, 1882). Sin embargo, la especie descrita por Lambl recibe diversas denominaciones entre los años 1888 y 1920; de hecho, diversos autores sugieren los nombres de *Lamblia intestinalis* (Blanchard, 1888); *Giardia duodenalis* (Stiles, 1902); *Giardia lamblia* (Kofoid y Christiansen, 1915) y *Giardia enterica* (Kofoid, 1920).

Ante esta situación, Filice (1952) publicó una descripción detallada de la morfología del género *Giardia* y propuso, basado fundamentalmente en las características estructurales del protozoo, que solo fueran reconocidas tres especies del parásito: *G. duodenalis*, observada en el hombre y en otros mamíferos; *G. agilis*, detectada en anfibios y *Giardia muris*, identificada en ratones. La propuesta de Filice, aunque propició una importante racionalización al caos taxonómico prevaleciente, era solo una solución temporal.

La variabilidad fenotípica entre aislados de *Giardia* procedentes de diferentes hospedadores sugería la existencia de otras especies, pero las limitaciones tecnológicas de aquellos años impedían demostrarlo. Años más tarde, la mayor resolución de la microscopía electrónica permitió hallar diferencias morfológicas adicionales entre aislados, lo que condujo a la descripción de otras dos especies: *Giardia ardeae* y *Giardia psittaci*, ambas observadas en aves (Erlandsen y Bemrick, 1987; Erlandsen y col., 1990).

Posteriormente, la aplicación de técnicas de biología molecular, al igual que sucede para *Cryptosporidium*, ha permitido la caracterización genética de aislados obtenidos directamente de muestras fecales o ambientales, validando la existencia de diferentes especies y/o genotipos en cada hospedador. De hecho, estos hallazgos moleculares junto con la utilización de criterios fenotípicos y epidemiológicos han conducido a la descripción de una nueva especie, *Giardia microti* que infecta a roedores silvestres así como a la presencia de varios genotipos de *G. duodenalis* (van Keulen y col., 1998; Adam, 2001).

Sin embargo, diversos autores indican que *G. duodenalis* (= *G. lamblia*, *G. intestinalis*) es un complejo de especies pues, bajo la misma apariencia morfológica, los datos de epidemiología molecular indican que los genotipos A-G, ampliamente reconocidos, deben considerarse *G. duodenalis* (Appelbee y col., 2005; Feng y Xiao, 2011). No obstante, otros autores proponen que estos genotipos podrían ser especies diferentes de *Giardia* adaptadas específicamente a cada clase de hospedador (Thompson y col., 2008; Monis y col., 2009).

### 1.1.1. Especies y genotipos de *Cryptosporidium* y *Giardia*

El género *Cryptosporidium* incluye un grupo de parásitos intracelulares extracitoplasmáticos pertenecientes al Phylum Apicomplexa, Clase Coccidea, Orden Eucoccidiorida, Familia Cryptosporidiidae. Se trata de protozoos que, en algunos estadios de su desarrollo, poseen un complejo apical que interviene en la invasión de las células hospedadoras. Las especies de este género han sido identificadas en más de 150 especies de mamíferos, incluyendo el hombre, así como aves, reptiles, anfibios y peces (Fayer, 2010). Sin embargo, el género *Cryptosporidium* se ha considerado un coccidio atípico por su capacidad de autoinfección endógena al esporular los ooquistes de pared fina en el intestino y provocar una reinvasión constante de los enterocitos en individuos inmunocomprometidos (Current y García, 1991; O'Donogue, 1995), además de su resistencia a la mayoría de los fármacos anticoccidiales lo cual podría estar relacionado con su particular localización en la célula hospedadora (Göebel y Brandler, 1982; Coombs y col., 1997; Coombs, 1999).

Por otra parte, existen propiedades bioquímicas que diferencian a *Cryptosporidium* de otros géneros supuestamente próximos (Denton y col., 1996; Coombs y col., 1997; Keithly y col., 1997). También la aparente ausencia de un genoma extranuclear y de un plástido característico de los Apicomplexa (Gleeson, 2000; Zhu y col., 2000; Barta y Thompson, 2006), así como la presencia de una posible mitocondria inusual, la ausencia de esporocistos, micropilo y gránulos polares; son otras particularidades que caracterizan a *Cryptosporidium* (Armson y col., 2003; Abrahamsen y col., 2004; Putignani y col., 2004; Xu y col., 2004).

Tradicionalmente, los criterios utilizados para la definición de especie se han basado en la especificidad del hospedador, la morfometría de los ooquistes o los tejidos donde se produce la infección. Sin embargo, estos criterios son insuficientes para denominar correctamente las especies de este género, ya que por ejemplo, los ooquistes de determinadas especies del parásito son morfológicamente indistinguibles entre sí.

En la década de los años 90, se llevaron a cabo numerosos estudios basados en técnicas bioquímicas, tales como el análisis de isoenzimas o electroforesis, que pusieron de manifiesto la existencia de una considerable heterogeneidad en la composición proteica, antigénica y enzimática de diferentes especies de *Cryptosporidium* (Mead y col., 1990; Awad-El-Kariem y col., 1998). Sin embargo, la aplicación de este tipo de técnicas se ha visto limitada por la elevada cantidad de ooquistes purificados que precisan. Posteriormente, el desarrollo de las técnicas de biología molecular ha supuesto uno de los avances más importantes para la comprensión de la diversidad genética de *Cryptosporidium* spp. y ha permitido confirmar la existencia de un gran número de especies en diferentes clases de vertebrados (Jirků y col., 2008; Xiao y Fayer, 2008; Plutzer y Karanis, 2009; Fayer, 2010).

El desarrollo de estas técnicas ha llevado a modificar las pautas a seguir para definir una nueva especie de *Cryptosporidium*, que se debe fundamentar tanto en criterios biológicos como moleculares. Así, en el año 2002 y durante la celebración del “6<sup>th</sup> International Meeting on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infections Disease”, celebrado en París (Francia), se sugirió que para la designación de nuevas especies de *Cryptosporidium* se deberían de cumplir cuatro requisitos básicos: 1) estudios morfométricos de los ooquistes; 2) caracterización genética de loci comunes; 3) demostrar la existencia de especificidad de hospedadores naturales y si es posible, experimentales y 4) conformidad con las reglas de la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) (Xiao y Ryan, 2004). La especificidad del hospedador puede variar considerablemente dependiendo de la especie, de tal forma que alguna, como *C. parvum*, infecta a un amplio rango de vertebrados mientras que otras están restringidas a un número reducido de hospedadores, por ejemplo *Cryptosporidium wrairi*. La aceptación de los criterios mencionados ha llevado a invalidar o a reclasificar las especies que se reconocían hasta ese momento. De hecho, algunas han sido consideradas *nomen nudum*, al no disponer de información suficiente para poder identificarlas correctamente –*Cryptosporidium ameivae*, *Cryptosporidium anserinum* y *Cryptosporidium nasorum*– mientras que otras –*Cryptosporidium crotali* o *Cryptosporidium vulpis*– han sido incluidas en el género *Sarcocystis* (Fayer, 2008, 2010).

En relación con esta diversidad genética en *Cryptosporidium* spp., otro aspecto a tener en cuenta es la diferenciación inter e intraespecífica, que ha permitido describir genotipos en algunas especies del parásito. Sin embargo, los genotipos se pueden considerar una especie nueva en el momento en que reúnan los cuatro requisitos básicos anteriormente citados; por lo que se consideran descriptores temporales. En este sentido, numerosas especies de *Cryptosporidium* aceptadas en la actualidad –*Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium cuniculus*, *Cryptosporidium fayeri*, *Cryptosporidium macropodum*, *Cryptosporidium ryanae*, *Cryptosporidium suis*, *Cryptosporidium tizzery*, *Cryptosporidium ubiquitum* y *Cryptosporidium xiaoi*– han sido consideradas, inicialmente, genotipos (Fayer y col., 2001, 2005, 2008, 2010b; Power y Ryan, 2008; Ryan y col., 2008; Fayer y Santin, 2009; Robinson y col., 2010; Ren y col., 2012).

En la Tabla 1 (A-D) se muestran las 24 especies del género *Cryptosporidium* que hasta la fecha, se consideran válidas; el hospedador principal al que parasitan y su localización primaria. Sin embargo, este número puede variar ya que existe cierta controversia sobre la validez de algunas especies (Slapeta, 2012; Xiao y col., 2012). Además, se han descrito alrededor de 60 genotipos, de los cuales, el genotipo mono, porcino, mofeta, caballo y ratón han sido identificados en el hombre (Plutzer y Karanis, 2009).

**Tabla 1.** Especies de *Cryptosporidium* que infectan a mamíferos (A), aves (B), anfibios y reptiles (C) y peces (D).

**A**

Especie	Hospedador principal	Localización primaria
<i>C. andersoni</i> *	<i>Bos taurus</i> (ganado bovino)	Gástrica
<i>C. bovis</i>	<i>Bos taurus</i> (ganado bovino)	Desconocida
<i>C. canis</i> *	<i>Canis familiaris</i> (perro doméstico)	Intestinal
<i>C. cuniculus</i> *	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo europeo)	Intestinal
<i>C. fayeri</i> *	<i>Macropus rufus</i> (canguro rojo)	Desconocida
<i>C. felis</i> *	<i>Felis catis</i> (gato doméstico)	Intestinal
<i>C. hominis</i> *	<i>Homo sapiens</i> (hombre)	Intestinal
<i>C. macropodum</i>	<i>Macropus giganteus</i> (canguro gris)	Desconocida
<i>C. muris</i> *	<i>Mus musculus</i> (ratón doméstico)	Gástrica
<i>C. parvum</i> *	<i>Mus musculus</i> (ratón doméstico)	Intestinal
<i>C. ryanae</i>	<i>Bos taurus</i> (ganado bovino)	Desconocida
<i>C. suis</i> *	<i>Sus scrofa</i> (cerdo)	Intestinal
<i>C. tyzzery</i>	<i>Mus musculus</i> (ratón doméstico)	Intestinal
<i>C. ubiquitum</i> *	<i>Bos taurus</i> (ganado bovino)	Intestinal
<i>C. wrairi</i>	<i>Cavia porcellus</i> (cobaya)	Intestinal
<i>C. xiaoi</i>	<i>Ovis aries</i> (oveja)	Desconocida

**B**

Especie	Hospedador principal	Localización primaria
<i>C. baileyi</i> *	<i>Gallus gallus</i> (pollo)	Intestinal
<i>C. galli</i>	<i>Gallus gallus</i> (pollo)	Gástrica; proventrículo
<i>C. meleagridis</i> *	<i>Meleagris gallopavo</i> (pavo)	Intestinal

**C**

Especie	Hospedador principal	Localización primaria
<i>C. fragile</i>	<i>Duttaphrynus melanostictus</i> (sapo asiático común)	Gástrica
<i>C. serpentis</i>	<i>Elaphe guttata</i> (serpiente del maíz)	Gástrica
<i>C. varanii</i>	<i>Varanus prasinus</i> (varano esmeralda)	Gástrica

**D**

Especie	Hospedador principal	Localización primaria
<i>C. molnari</i>	<i>Sparus aurata</i> (dorada) <i>Dicentrarchus labrax</i> (lubina)	Gástrica
<i>C. scopthalmi</i>	<i>Scophthalmi maximus</i> (rodaballo)	Intestinal

\*: especies con capacidad de transmisión zoonótica.

El conocimiento de la totalidad del genoma de las dos especies más ampliamente distribuidas de *Cryptosporidium* –*C. hominis* y *C. parvum*– ha permitido la aplicación de técnicas moleculares altamente específicas que facilitan la identificación, en estas especies, de variantes genéticas o subtipos con diferencias en su especificidad de hospedador (Abrahamsen y col., 2004; Xu y col., 2004; Hunter y col., 2007). De hecho, se han identificado un total de siete familias entre los aislados de *C. hominis* (Ia-Ig) y 11 familias en *C. parvum* (IIa-III; IIk, III) (Plutzer y Karanis, 2009; Xiao, 2010). La existencia de subtipos de *C. parvum* exclusivos del hombre y otros compartidos por los rumiantes domésticos, confirma que esta especie se mantiene mediante dos ciclos de transmisión, zoonótico y antroponótico, reflejando la complejidad epidemiológica del mantenimiento de este patógeno en el ambiente (Cacciò, 2005; Quílez y col., 2008a,b). Por tanto, estas técnicas moleculares se consideran herramientas de gran utilidad en estudios epidemiológicos ya que permiten comprender mejor la estructura de poblaciones del parásito y ayudan a determinar la implicación de uno o varios aislados en un posible brote de cryptosporidiosis.

Por otra parte, la evolución del conocimiento sobre la taxonomía del género *Giardia* ha transcurrido, básicamente, en dos etapas: una primera, marcada por la descripción de tantas especies del parásito como especies de hospedadores en las que este fue hallado, la cual culmina con un trabajo sobre aspectos morfológicos del protozoo publicado por Filice en 1952, que redujo a tres el número de especies del género; y una segunda, basada en el conocimiento de las características genéticas del parásito provenientes de diferentes hospedadores.

Según la clasificación taxonómica de los protozoos realizada por Levine en 1980, basada en la morfología, *Giardia* era ubicada en el Phylum Sarcomastigophora, Subphylum Mastigophora (=Flagellata), Clase Zoomastigophorea, Orden Diplomonadida y Familia Hexamitidae. Sin embargo, de acuerdo con la nueva sistemática basada en datos genéticos, estructurales y bioquímicos, en los últimos años la taxonomía de los protozoos parásitos ha sufrido importantes modificaciones. Así, los flagelados pertenecientes al Phylum Sarcomastigophora, se dividieron en cuatro Phyla: Parabasalia, Perolozoa, Euglenozoa y Metamonada. Según la clasificación actual, el género *Giardia* se encuadra en el Phylum Metamonada, Subphylum Trichozoa, Clase Trepomonadea, Subclase Diplozoa, Orden Giardiida y Familia Giardiidae (Cox, 2002; Cavalier-Smith, 2003; Plutzer y col., 2010).

En relación con la diferenciación inter e intraespecífica de *Giardia* spp. y en base a estudios morfométricos y de biología molecular; hasta la fecha, se consideran válidas seis especies (Plutzer y col., 2010) que infectan a anfibios (*G. agilis*); aves (*G. ardeae*, *G. psittaci*); diversos mamíferos incluido el hombre, *G. duodenalis* (= *G. lamblia*, *G. intestinalis*) y roedores (*G. muris*, *G. microti*).

La información sobre el genoma de *G. duodenalis* obtenida mediante la secuenciación de diferentes genes se ha incrementado sustancialmente en los últimos años y la heterogeneidad genética de esta especie ha sido documentada por diversos autores (Morrison y Svärd, 2011). En la actualidad, se reconocen siete genotipos de *G. duodenalis*: A (subtipos A-I, A-II) y B responsables de rutas zoonóticas, mientras que los genotipos C, D, E, F y G, presentan una fuerte especificidad de hospedador (Tabla 2). No obstante, estos cinco últimos genotipos han sido identificados, en ocasiones puntuales, en varias especies animales e incluso en el hombre. De hecho, los genotipos C y D se identificaron en gatos (Read y col., 2004; Palmer y col., 2008) y en el hombre (Traub y col., 2009); el genotipo D se detectó en cerdos (Langkjaer y col., 2007; Sprong y col., 2009); el genotipo E se observó en gatos (Read y col., 2004; Lebbad y col., 2010) y también en el hombre (Foronda y col., 2008); finalmente, el genotipo F se identificó en un cerdo (Armson y col., 2009) y en pacientes inmunocomprometidos (Gelanew y col., 2007).

**Tabla 2.** Especies de *Giardia* (A) y genotipos de *G. duodenalis* (B) actualmente reconocidos.

<b>A</b>	
<b>Especie</b>	<b>Hospedador principal</b>
<i>G. agilis</i>	<i>Bufo</i> sp. (sapo)
<i>G. ardeae</i>	<i>Ardea cinerea</i> (garza real)
<i>G. duodenalis</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo)
<i>G. microti</i>	<i>Microtus ochrogaster</i> (ratón de las praderas)
<i>G. muris</i>	<i>Mus musculus</i> (ratón doméstico)
<i>G. psittaci</i>	<i>Melopsittacus undulatus</i> (periquito)
<b>B</b>	
<b>Genotipos</b>	<b>Hospedadores</b>
A	Hombre, primates, perro, gato, rumiantes domésticos, roedores, mamíferos silvestres
B	Hombre, primates, perro, caballo, rumiantes domésticos
C	Cánidos
D	Cánidos
E	Artiodáctilos
F	Gato
G	Roedores



Respecto al genotipo A, se ha identificado un tercer subtipo, denominado A-III, que parece estar relacionado principalmente con los ungulados silvestres (Robertson y col., 2007; Cacciò y col., 2008); sin embargo, recientemente este subtipo también se ha identificado en gatos y terneros lactantes, aunque no ha sido detectado en el hombre (Sprong y col., 2009; Feng y Xiao, 2011). Al igual que sucede con la diversidad intraespecífica de *Cryptosporidium* spp., diversos autores consideran que algunos genotipos de *G. duodenalis* se podrían considerar una especie (Thompson y Monis, 2004; Thompson y col., 2008; Monis y col., 2009) y han propuesto los nombres de *G. duodenalis* (genotipo A); *G. enterica* (genotipo B); *G. canis* (genotipos C y D); *G. bovis* (genotipo E); *G. cati* (genotipo F) y *G. simondi* (genotipo G). Sin embargo, esta nomenclatura no está aceptada por la comunidad científica ya que se considera necesario realizar más estudios moleculares y de especificidad de hospedadores naturales e incluso experimentales (Feng y Xiao, 2011).

Recientemente, se identificó el genotipo H a partir de aislados quísticos procedentes de focas en Estados Unidos (Lasek-Nesselquist y col., 2010). Sin embargo, la identificación de este genotipo se basó únicamente en el análisis del gen glutamato deshidrogenasa (Gaydos y col., 2008), por lo que sería necesario el análisis de diversos loci ( $\beta$ -giardina, pequeña subunidad ribosomal del ARNr y el factor de elongación 1 alfa) para aceptar este nuevo genotipo de *G. duodenalis* (Feng y Xiao, 2011).

#### 1.1.2. Biología de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp.

La cryptosporidiosis se transmite vía fecal-oral, por la ingestión de ooquistes (3-8  $\mu$ m) de *Cryptosporidium* spp. La pared del ooquiste es trilaminar de aproximadamente 40 nm de grosor (Petry, 2004) y presenta una sutura en uno de los extremos que se disuelve durante el desenquistamiento a nivel del tracto gastrointestinal (Dubey y col., 1990).

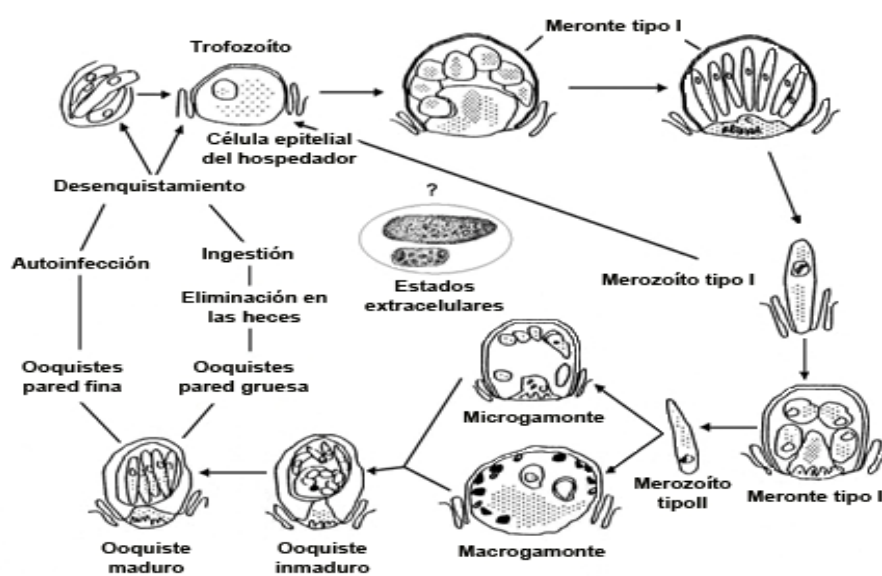
Los cuatro esporozoítos liberados, mediante movimientos de contracción/distensión y deslizamiento consiguen alcanzar el borde luminal de los enterocitos. Factores como la temperatura corporal y un efecto combinado de las sales biliares y la tripsina influyen en esta fase (Current y Haynes, 1984). Los esporozoítos provocan una invaginación y son englobados por la membrana de la célula hospedadora en el interior de una vacuola parasitófora, de naturaleza intracelular pero extracitoplasmática (Göebel y Brandler, 1982; Chappell y col., 2003). Esta localización, probablemente está relacionada con una mayor resistencia a los agentes antimicrobianos (Huang y White, 2006; Boulter-Bitzer y col., 2007).

El parásito se encuentra separado del citoplasma celular, por el orgánulo alimentador de membrana o zona de adhesión, a través del cual se produce la obtención de nutrientes a partir de la célula hospedadora (Spano y Crisanti, 2000). El trofozoíto se diferencia en los



estados de esquizonte o meronte, siendo los primeros estados que se forman los esquizontes tipo I, que darán lugar a ocho merozoítos tipo I. Una vez liberados a la luz intestinal, los merozoítos van a invadir las células adyacentes pudiendo formar de nuevo merontes tipo I o merontes tipo II. Los merozoítos tipo II liberados por estos últimos, serán los únicos capaces de diferenciarse mediante multiplicación sexual (gametogonia) dando lugar a los gamontes (Fayer y col., 1997; Tzipori y Widmer, 2000). Durante la microgametogénesis se producen muchas secuencias de replicación que dan lugar a la liberación de un gran número de microgametos a la luz intestinal. Los microgametos van a fijarse a través de su polo apical a la superficie de la célula hospedadora parasitada por el macrogamonte (Figura 1).

**Figura 1.** Esquema del ciclo biológico de *C. parvum* (Fayer, 2008).



El cigoto resultante sufre un proceso de esporogonia dando lugar a oocistos esporulados de pared fina responsables de la autoinfección, y de pared gruesa que serán excretados con las heces (Current, 1985; Fayer y col., 1997). Estos últimos pueden permanecer viables en lugares húmedos y con bajas temperaturas durante meses, especialmente en climas muy fríos donde la temperatura en los lagos, ríos y charcas es muy baja aunque no se alcance la temperatura de congelación. Los oocistos también pueden resistir los procesos de potabilización y depuración de aguas así como la acción de desinfectantes habitualmente empleados.

El ciclo biológico de *Cryptosporidium* puede completarse en tan sólo dos días. Diversos autores comprobaron que el período de prepatencia varía según el hospedador y la especie de *Cryptosporidium*. Experimentalmente se determinaron períodos de prepatencia de 2-7 días en

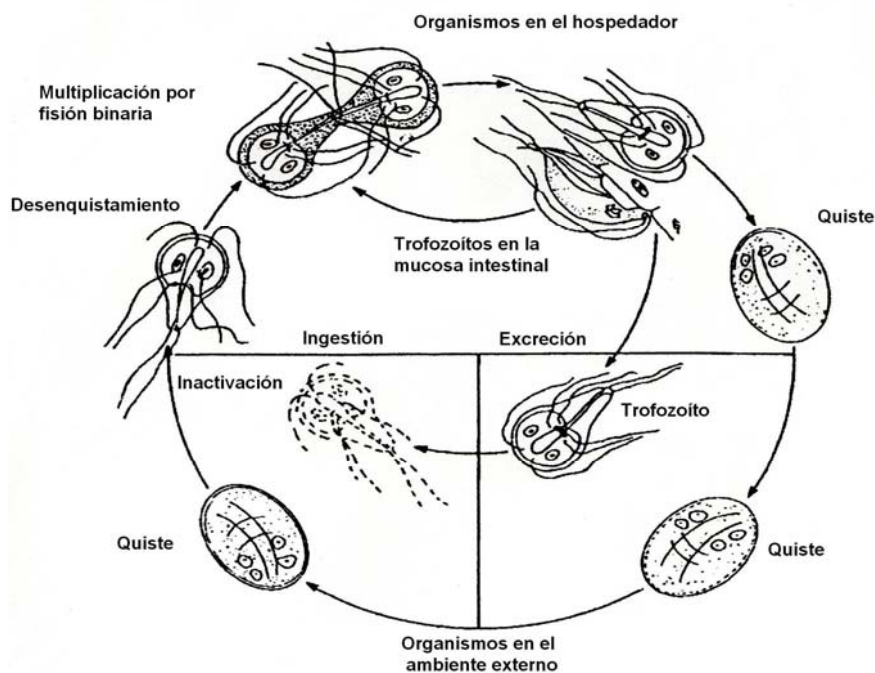
rumiantes domésticos (Tzipori y col., 1981, 1983; Thompson y col., 2005); 2-14 días en perros (Augustin-Bichl y col., 1984) y 5-10 días en gatos (Iseki, 1979). En el hombre, se considera que este período oscila entre 5-28 días con una media de 7,2 días. DuPont y col. (1995), realizaron un estudio con voluntarios sanos estableciéndose un período máximo de prepatencia de nueve días. Respecto al período de patencia, también se ha comprobado que varía entre los distintos hospedadores, oscilando entre 2-16 días en rumiantes domésticos (Tzipori y col., 1981; Tzipori y col., 1983); entre 3-33 días en perros y entre 7-10 días en gatos (Augustin-Bichl y col., 1984). En personas inmunocompetentes, la eliminación oscila entre 18-31 días, aunque la excreción puede continuar de forma intermitente llegando incluso a detectarse hasta 75-89 días después de cesar la excreción (Jokipii y Jokipii, 1986; Chappell y col., 2006).

La localización primaria de *Cryptosporidium* suele ser el intestino delgado -yeyuno e íleon principalmente-; el intestino grueso -ciego y colon preferentemente- y en algunos casos puede parasitar todo el tracto intestinal (Sanford y Josephson, 1982). Además, se ha localizado en algunas ocasiones extraintestinalmente: en el ojo (Lindsay y col., 1987; Baskin, 1996), conductos biliares (Fleta y col., 1995; Cimon y col., 1996; de Souza y col., 2004), en la mucosa de la tráquea y en el tejido pulmonar de ovinos (Sánchez-Acedo y col., 1991a), tracto respiratorio (Fleta y col., 1995; Mercado y col., 2007; van Zeeland y col., 2008). También se han encontrado en la superficie de las células epiteliales no ciliadas de los bronquios y en macrófagos alveolares de terneros (Mascaró y col., 1994), así como en los ganglios mesentéricos y en el útero de corderos (Fleta y col., 1995).

La giardiosis se transmite vía fecal-oral por la ingestión de quistes (8-12  $\mu\text{m}$ ) de *Giardia* spp. Poseen un citoplasma granular, fino, claramente separado de una pared quística de 0,3  $\mu\text{m}$  de espesor adosada a la membrana plasmática del parásito. La pared del quiste es refráctil y su porción externa presenta una estructura fibrilar compuesta por 7-20 filamentos, mientras que la porción interna es membranosa. Ambas están separadas por el espacio periplasmático. En el citoplasma del quiste se observan también ocho axonemas, seis de ellos localizados en el área central y dos en la periferia. Asociados a los axonemas se encuentran dos láminas de microtúbulos, paralelos a los axonemas centrales; cada una de estas láminas está formada por 10-20 microtúbulos que representan al axostilo. También se observan numerosos ribosomas, vacuolas y fragmentos del disco ventral. Por el contrario, no presentan mitocondrias, aparato de Golgi, ni retículo endoplasmático rugoso (Abdul-Wahid y Faubert, 2004; Graczyk, 2005; Smith y col., 2012). Los quistes inmaduros tienen dos núcleos y los quistes maduros son tetranucleados. El cariosoma nuclear puede tener una posición central o excéntrica y la membrana nuclear carece de cromatina periférica. La actividad metabólica de los quistes es menor del 20,0% de la desarrollada por los trofozoítos (Adam, 2001). Los trofozoítos se

adhieren a las células epiteliales del intestino delgado por medio de los discos de succión. Tras la fijación se reproducen asexualmente por fisión binaria (Figura 2). Durante la multiplicación se produce la división nuclear, seguida del aparato neuromotor y del disco ventral, originándose finalmente, dos trofozoítos hijos que migran hacia la parte terminal del intestino delgado dando lugar al enquistamiento (Gillin y col., 1987). Tras este proceso se forma la pared de un quiste maduro, altamente resistente e infectante, que será eliminado al ambiente con las heces del hospedador (Meyer y Jarroll, 1980; Thompson, 2000).

**Figura 2.** Esquema del ciclo biológico de *G. duodenalis* (Smith y col., 2007).



La principal característica de la forma quística es su pared rígida, de naturaleza glicoproteica que protege al parásito de las condiciones ambientales adversas. Estas formas infectantes resisten a temperaturas inferiores a 60°C en el agua durante dos meses y pueden permanecer viables tras la acción de numerosos desinfectantes (Adam, 2001). Al igual que en *Cryptosporidium*, los períodos de prepatencia y patencia varían según el tipo de hospedador y la especie de *Giardia*. Así, el período de prepatencia en rumiantes domésticos oscila entre 6-21 días (Taminelli y col., 1989; Koudela y Vitovec, 1998) y se ha observado que estos animales eliminan quistes durante períodos que oscilan entre 3-30 días (Xiao, 1994; Ralston y col., 2003). En personas inmunocompetentes, se ha comprobado que el período medio de prepatencia es de 3-14 días y la eliminación de quistes de *G. duodenalis*, generalmente de forma intermitente, puede producirse durante 2-3 meses (Adam, 2001).

## 2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

### 2.1. Importancia de la cryptosporidiosis y de la giardiosis

Los protozoos pertenecientes a los géneros *Cryptosporidium* y *Giardia* se han estudiado, en numerosas ocasiones, conjuntamente debido a que estos parásitos presentan ciertas características biológicas comunes que van a determinar los aspectos epidemiológicos generales de ambas infecciones; por ejemplo, el tamaño pequeño de las formas infectantes; la resistencia de los (oo)quistes a las condiciones ambientales y a los desinfectantes habitualmente empleados; la baja dosis infectante; la capacidad para multiplicarse en un mismo hospedador; y en el caso de *Cryptosporidium* spp., la ausencia de un tratamiento totalmente eficaz, son algunos de los factores que facilitan la difusión de ambos enteropatógenos (Slifko y col., 2000; Thompson, 2000; Fayer, 2004; Hunter y Thompson, 2005; Monis y col., 2009).

Sin embargo, los datos publicados de prevalencia de la cryptosporidiosis y de la giardiosis tanto en el ámbito de la sanidad animal como de la salud pública son muy diferentes al variar, entre otros, parámetros como la edad del hospedador en el momento del muestreo, el número de muestras analizadas, la metodología aplicada, la presencia/ausencia de sintomatología o el planteamiento del estudio.

Se han llevado a cabo numerosos trabajos epidemiológicos en rumiantes domésticos basados tanto en estudios transversales (Castro-Hermida y col., 2002a, 2006b,c; Causapé, y col., 2002; Geurden y col., 2008; Yang y col., 2009) como longitudinales (O'Handley y col., 1999; Castro-Hermida y col., 2002b; Santín y col., 2008, 2009; Robertson y col., 2010; Sweeny y col., 2011). Otros factores como la edad de los animales, las prácticas de manejo y la alimentación; así como, la presencia o ausencia de sintomatología también pueden contribuir a los diferentes valores de infección detectados (Fayer y col., 2000b; Huetink y col., 2001). De hecho, se observó que en el caso de *C. parvum*, tras remitir la infección, los animales desarrollan cierta inmunidad volviéndose resistentes a posteriores infecciones; además, los síntomas clínicos asociados a la exposición primaria disminuyen con la edad, así como el período de patencia y la intensidad de la excreción ooquistica (Harp y col., 1990; Ortega-Mora y Wright, 1994; Coklin y col., 2010). Asimismo, los animales adultos asintomáticos pueden actuar como reservorios de la infección en las explotaciones ganaderas (Fayer y col., 2000b; Castro-Hermida y col., 2007a,b).

Al igual que sucede en los animales, los datos de prevalencia de ambas enfermedades en el hombre van a estar influenciados también por la edad, el estado inmunológico, el contacto con animales y/o la presencia de individuos asintomáticos (Nichols, 2008; Pollock y col., 2008; Davies y col., 2009). Ambas parasitosis afectan prácticamente a individuos de todas las edades. Entre las personas inmunocompetentes, los grupos con mayor susceptibilidad están

constituidos por niños y en menor proporción por adultos. No obstante, el riesgo de infección no parece incrementarse con la edad, probablemente debido a la larga exposición al parásito durante la vida, aunque se han diagnosticado casos en personas de edad avanzada (Thompson y Smith, 2011). Un grupo de alto riesgo para el padecimiento de estas enfermedades es el constituido por personas inmunocomprometidas, principalmente enfermos afectados por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o con otras enfermedades del sistema inmunitario, así como los sometidos a terapia inmunosupresora. Estas infecciones han sido diagnosticadas en numerosos países de todo el mundo, lo que confirma el carácter cosmopolita y ubicuo de estos parásitos. No obstante, la recopilación de numerosos trabajos refleja una mayor prevalencia de la infección en países en vías de desarrollo (Nichols, 2008; Thompson, 2008; Cacciò y Sprong, 2011). La legislación sobre notificación de casos de cryptosporidiosis y giardiosis en el hombre varía según los países; por ejemplo, estas enfermedades son de declaración obligatoria en Estados Unidos, mientras que en los países de la Unión Europea solo en el Reino Unido su declaración es obligatoria cuando se considera que ambas parasitosis han sido transmitidas por agua o alimentos, por lo que los datos de prevalencia reales posiblemente son mayores de los que se disponen (Hajdu y col., 2008; Davies y Chalmers, 2009; DWI, 2010). En España, la cryptosporidiosis y la giardiosis son enfermedades sujetas a vigilancia epidemiológica desde el año 2009, y están incluidas en los listados de enfermedades transmitidas por alimentos y agua que deben ser comunicadas al Sistema de Información Microbiológica (Centro Nacional de Epidemiología, 2008, 2011). Además, en algunas comunidades autónomas como Andalucía se incluye, concretamente, la cryptosporidiosis en la lista de enfermedades de declaración obligatoria (BOJA, núm. 4, de 8 de enero de 2009). La información extraída de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Economía y Competitividad muestra que en el año 2009 se comunicaron 307 casos de cryptosporidiosis frente a 867 casos de giardiosis (Centro Nacional de Epidemiología, 2008, 2011).

Por otra parte, los valores de prevalencia de estas enfermedades van a estar condicionados también por los métodos de diagnóstico utilizados. Así, la confirmación de estas infecciones en los animales o en el hombre requiere pruebas de laboratorio que identifiquen la presencia del parásito o sus antígenos en las heces, fluidos corporales o tejidos del hospedador, bien mediante técnicas de concentración y tinción específicas para visualizar los (oo)quistes al microscopio o bien mediante técnicas histológicas para visualizar los estadios de desarrollo en el intestino. Si bien las técnicas microscópicas e inmunológicas resultan suficientes para realizar el diagnóstico de estas enfermedades, su utilidad es limitada para identificar las especies, genotipos o subtipos de *Cryptosporidium* y *Giardia*. Además, en la

mayoría de las ocasiones, las formas infectantes de las distintas especies y/o genotipos no pueden ser diferenciados por su tamaño, forma e incluso características de tinción, siendo necesario recurrir a diversas técnicas de biología molecular (Zarlenga y Trout, 2004; Sunnotel y col., 2006; Wilson y Hankenson, 2010; Kashyap y col., 2010). Así, destaca la amplificación de fragmentos de diversos genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para su posterior secuenciación o análisis con enzimas de restricción. En algunos estudios epidemiológicos también se realiza la investigación de regiones microsatélites o el análisis de polimorfismo conformacional de hebra sencilla, entre otros (Cacciò, 2004; Smith, 2008; Smith y Mank, 2011).

#### 2.1.1. En animales domésticos y silvestres

La cryptosporidiosis y la giardiosis son dos enfermedades parasitarias que tienen un gran interés económico desde el punto de vista de la sanidad animal, especialmente en los rumiantes domésticos durante el período de crecimiento, momento en el que son más receptivos a las infecciones y cuando estas producen efectos más graves. De hecho, *Cryptosporidium* spp. es uno de los principales agentes etiológicos del síndrome de diarrea neonatal en bovinos, ovinos y caprinos, ocasionando importantes pérdidas económicas debido a que puede causar una fuerte deshidratación que conlleva un retraso en el crecimiento de los animales. Incluso en ausencia de otros enteropatógenos, la infección por *Cryptosporidium* spp. puede ocasionar elevadas tasas de mortalidad y la morbilidad puede llegar a alcanzar el 100% (Matos-Fernández y col., 1994; de Graaf y col., 1999; O'Handley y Olson, 2006). La giardiosis también produce síndrome de mal absorción, pérdida de peso, diarrea y por consiguiente, mala conversión alimenticia e importantes pérdidas económicas para los ganaderos (Aloisio y col., 2006). Estas enfermedades son lo suficientemente graves como para justificar importantes inversiones en medicamentos y asistencia veterinaria que, evidentemente, suponen un gasto adicional.

En relación con la cryptosporidiosis, hemos de señalar que no existe un tratamiento farmacológico plenamente eficaz (Stockdale y col., 2008). Sin embargo, en rumiantes recién nacidos y de hasta tres meses de edad, las moléculas que han demostrado una cierta eficacia fueron el lactato de halofuginona (Villacorta y col., 1991b; Naciri y col., 1993; Causapé y col., 1999; Lefay y col., 2001); la paromomicina (Fayer y Ellis, 1993; Mancassola y col., 1995; Chartier y col., 1996; Viu y col., 2000) y las ciclodextrinas (Castro-Hermida y col., 2001a,b, 2004) que ofrecieron un descenso en la intensidad de parasitación cuando se administraron a corderos y terneros infectados tanto experimental como naturalmente. Respecto al tratamiento de la giardiosis animal, existen diversos principios activos que son altamente eficaces en

animales de compañía, especialmente perros y gatos; sin embargo, no existe un tratamiento totalmente eficaz en rumiantes domésticos (Geurden y Olson, 2011). Entre los principios activos que tienen actividad frente a *Giardia* spp. destacan el grupo de moléculas pertenecientes a los benzimidazoles, con conocida actividad antihelmíntica de amplio espectro, y en particular albendazol (Xiao y col., 1996) y fenbendazol (O'Handley y col., 1997, 2000). También otro grupo moléculas, los nitroimidazoles, han mostrado buenos resultados; concretamente, metronidazol, tinidazol o furazolidona (Edling y col., 1990; Meloni y col., 1990; Xiao y col., 1993). Además, con el fin de disminuir a niveles permisibles las pérdidas económicas por morbilidad, se aconseja también un tratamiento sintomático. En este sentido, se suelen administrar electrolitos y líquidos por vía oral, y en algunas ocasiones por vía parenteral, con el único fin de paliar la posible deshidratación. En animales lactantes, se aconseja la restricción de acceso a la leche materna o artificial con el fin de evitar que ésta llegue sin digerir al intestino grueso donde por acción de la microflora se produciría una diarrea fermentativa. Asimismo, la administración de probióticos se ha recomendado por el efecto antagónico que supone la instauración de una flora beneficiosa en el intestino (Ortega-Mora y col., 1999a). Debido a la resistencia de los (oo)quistes a los desinfectantes, la instauración de medidas higiénico-sanitarias puede ayudar a eliminar o al menos a disminuir la presentación de las infecciones en zonas geográficas en donde son endémicas.

La infección por *Cryptosporidium* spp. en el ganado bovino fue descrita por primera vez por Panciera y col. (1971) quienes detectaron estados endógenos del parásito en el yeyuno de una novilla de ocho meses con diarrea crónica. En un principio, las manifestaciones clínicas observadas en los animales se asociaron con la presencia de este parásito y otros agentes enteropatógenos como bacterias y virus. Sin embargo, Pohlenz y col. (1978) concluyeron que *Cryptosporidium* sp. es el enteropatógeno más frecuente en terneros lactantes con diarrea. El papel como enteropatógeno primario de este protozoo no se dilucidó hasta la década de los años 80, cuando Tzipori y col. (1980b) le atribuyeron un brote de diarrea neonatal y con posterioridad se demostró experimentalmente su capacidad para causar procesos diarreicos en terneros (Tzipori y col., 1983; Heine y col., 1984).

En España, la primera descripción en el ganado bovino fue realizada por Juste y col. (1987). Posteriormente, se detectaron casos en la zona centro de nuestro país (Gómez-Bautista y col., 1989; de la Fuente y col., 1998, 1999); Galicia (Villacorta y col., 1989, 1991a; Castro-Hermida y col., 2002a, 2006a,c, 2007a); Cataluña (Gutiérrez y col., 1991); Aragón (Quílez-Cinca y col., 1992; Quílez Cinca, 1994; Quílez y col., 1996, 2008b); Tenerife (Dávila y col., 1993) y León (Matos-Fernández y col., 1993).



Con respecto a la cryptosporidiosis ovina, el primer diagnóstico tuvo lugar en una explotación australiana dedicada a la producción lechera donde los corderos presentaban diarrea entre la primera y la tercera semana de vida (Barker y Carbonell, 1974). Berg y col. (1978) también detectaron un brote de cryptosporidiosis en dos corderos lactantes con diarrea, pero su papel fundamental como agente causante de procesos diarreicos no se confirmó hasta que se realizaron infecciones experimentales en ausencia de otros agentes enteropatógenos (Tzipori y col., 1981; Angus y col., 1982; Snodgrass y col., 1984).

En nuestro país, la primera descripción en el ganado ovino fue realizada por Rojo-Vázquez y col. (1985). Estos autores identificaron *C. parvum* en el intestino y en las heces de corderos pertenecientes a la zona centro y noroeste de España. Posteriormente, se han comunicado casos de cryptosporidiosis ovina en diferentes regiones de la geografía española como en Extremadura (González y Respaldiza, 1987); en la zona centro (Gómez-Bautista y col., 1989; Requejo-Fernández y col., 1995; Ortega-Mora y col., 1999b); León (Pilar-Izquierdo y col., 1993; Matos-Fernández y col., 1994); Granada (Illescas y col., 1993); Aragón (de las Heras y col., 1987; Sánchez-Acedo y col., 1991b; Causapé y col., 2002) y Galicia (Ares-Mazás y col., 1988; Villacorta y col., 1991a; Castro-Hermida y col., 2006b, 2007a,b).

La cryptosporidiosis en rumiantes domésticos ha sido detectada prácticamente en todos los países en los que se ha investigado. La gran cantidad de trabajos publicados en los últimos años sobre infecciones esporádicas, brotes diarreicos o estudios epidemiológicos confirman el interés de la infección en estos animales (Majewska y col., 2000; Santín y col., 2004, 2007; Trout y col., 2004-2007; Chalmers y col., 2005; Ryan y col., 2005; Mendonça y col., 2007; Bajer, 2008; Geurden y col., 2008; Robertson, 2009; Fayer y col., 2010a; Robertson y col., 2010; Dixon y col., 2011; Sweeny y col., 2011). Sin embargo, existe una opinión generalizada por parte de los autores consultados de que la prevalencia de la cryptosporidiosis en rumiantes domésticos está subestimada debido a una variación en el número de muestras examinadas antes de cesar el período de lactancia. Así, cuando las heces de terneros recién nacidos se analizaron diariamente durante el primer mes de vida –período de alto riesgo– se comprobó que todos los animales adquirieron la infección (Castro-Hermida y col., 2002b). Por el contrario, cuando solo una muestra fecal es examinada por ternero durante todo el período de lactancia, menos de un 50,0% presentaron ooquistes en las heces (Castro-Hermida y col., 2002a). No obstante, la cryptosporidiosis también ha sido descrita en rumiantes domésticos de más edad e incluso, en animales adultos, circunstancia que puede representar una de las fuentes de infección y explicar el mantenimiento de la misma en determinadas zonas geográficas (Lorenzo-Lorenzo y col., 1993a; Scott y col., 1995; Quílez y col., 1996; Castro-Hermida y col., 2005, 2006a,b, 2007a,b; Maddox-Hyttel y col., 2006; Mendonça y col., 2007;



Geurden y col., 2008; Mueller-Doblies y col., 2008; Fayer y Santín, 2009; Chen y Huang, 2012). Además, Ortega-Mora y col. (1999b) comprobaron un aumento en la tasa de eliminación de ooquistes durante el período del parto, incrementándose así el riesgo de infección.

En los rumiantes domésticos, la mucosa intestinal sufre un daño provocado directamente por la esquizogonia y merogonia o indirectamente por la liberación de toxinas. Los cryptosporidia provocan atrofia de las vellosidades intestinales, determinando una disminución de la superficie de absorción e hipersecreción de líquido entérico que conduce a la pérdida de agua y electrolitos procedentes de los compartimentos plasmáticos. Estas diarreas secretoras están asociadas frecuentemente con bacterias capaces de elaborar enterotoxinas. El mecanismo patogénico puede deberse a la descarga de metabolitos tóxicos directamente en el enterocito infectado, además de las alteraciones en la superficie de la mucosa intestinal, con acortamiento de las microvellosidades, ensanchamiento de las criptas e infiltración leucocitaria de la lámina propia que pueden ser responsables de la disminución de la capacidad de absorción intestinal y de la diarrea (Heine y col., 1984).

Al igual que la cryptosporidiosis, la giardiosis ha sido detectada prácticamente en todos los países en los que se ha investigado. A pesar de que la información sobre giardiosis en rumiantes domésticos es inferior respecto a la recogida para la infección por *Cryptosporidium* spp., los estudios realizados en estos animales, han puesto de manifiesto la alta prevalencia observada, especialmente en el ganado bovino (Buret y col., 1990; Hamnes y col., 2006a; Maddox-Hyttel y col., 2006; Mendonça y col., 2007; Bajer, 2008; Nolan y col., 2010). En España las investigaciones sobre giardiosis en rumiantes domésticos son escasas. Destacan los estudios epidemiológicos realizados en Aragón (Quílez y col., 1996); Granada (Díaz y col., 1996); Galicia (Castro-Hermida y col., 2006b,c; 2007a,b), Valencia (Gómez-Muñoz y col., 2009, 2012) y País Vasco (Cardona y col., 2011).

En los rumiantes domésticos, el período de prepatencia oscila entorno a cuatro días. La infección se produce durante los primeros días de vida, con persistencia a lo largo de más de 10 semanas, eliminando una gran cantidad de quistes en las heces entre las semanas 5-10 de vida (Xiao, 1994). Así, un ternero puede eliminar  $10^9$  quistes/día, mientras que una vaca adulta la cifra, aunque menor ( $7,6 \times 10^5 - 7,2 \times 10^8$  quistes/día), sigue siendo significativa. El origen de la infección son los animales enfermos y los portadores asintomáticos eliminadores de quistes, generalmente adultos. Las hembras gestantes constituyen, como en otras protozoosis, la principal fuente de infección, ya que eliminan abundantes quistes al final de la gestación y durante los primeros días de lactancia (Xiao y col., 1994). Teniendo en cuenta la escasa especificidad por el hospedador, también pueden introducir la infección a otras especies animales tales como perros, gatos, e incluso el hombre.

Los trofozoítos de *G. duodenalis* se fijan a la mucosa del duodeno y yeyuno mediante un disco ventral y a un complejo de manosa-lectina que se une a receptores específicos del epitelio. La consecuencia patogénica es la reducción difusa de la altura de las microvellosidades intestinales, lo que implica la disminución de la superficie de absorción del intestino delgado. Asimismo, se produce la mal absorción de azúcares, ácidos grasos, vitaminas y proteínas. Esta parasitosis en muchas ocasiones es asintomática, pero se han descrito casos clínicos en rumiantes domésticos con síndromes de mal absorción y diarrea persistente, con heces mucosas, deshidratación, fiebre, apatía, alteración del apetito, distensión abdominal y dolor a la palpación, lo cual conduce a un retraso en el crecimiento e incluso la muerte (Olson y col., 1997; Thompson, 2000).

Por otra parte, estudios de biología molecular llevados a cabo con aislados de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. procedentes de rumiantes domésticos han revelado una mayor complejidad etiológica. De hecho, en el ganado bovino son cuatro las especies de *Cryptosporidium* más importantes actualmente descritas, con un patrón de aparición que está estrechamente relacionado con la edad. *C. parvum* es la especie predominante en terneros lactantes y es responsable de los brotes de diarrea neonatal, siendo por el contrario muy poco frecuente en terneros destetados o animales adultos, en los que se observa un marcado predominio de tres especies –*C. andersoni*, *C. bovis*, *C. ryanae*– las cuales están altamente adaptadas a los rumiantes y cuyo poder patógeno se desconoce (Santín y col., 2004, 2008; Leoni y col., 2006; Morse y col., 2007; Fayer y col., 2008). Esta circunstancia demuestra que solo los terneros neonatos suponen un riesgo desde un punto de vista de la salud pública (Fayer y col., 2006b; Thompson y col., 2007). Además, Fayer y col. (2007) indican que el porcentaje de animales con cryptosporidiosis causada por *C. parvum* se reduce desde un 85,0% en terneros recién nacidos hasta un 6,0% en animales mayores de dos meses, por lo que el ganado bovino adulto desempeñaría un papel poco relevante como reservorio zoonótico de la infección. Los estudios moleculares en pequeños rumiantes son mucho más escasos y han revelado la receptividad de estos animales a un amplio abanico de especies (*C. andersoni*, *C. bovis*, *C. fayeri*, *C. hominis*, *C. suis*, *C. ubiquitum*, *C. xiaoi*) y genotipos (porcino tipo II, marsupial y ovino I), si bien es también *C. parvum* la especie generalmente implicada en la etiología de los brotes de diarrea neonatal en estos hospedadores, reflejando de nuevo su contribución potencial a la cryptosporidiosis de origen zoonótico (Ryan y col., 2005; Santín y col., 2007; Elwin y Chalmers, 2008; Quílez y col., 2008a; Robertson, 2009; Yang y col., 2009; Díaz y col., 2010a; Wang y col., 2010; Sweeny y col., 2011; Paraud y Chartier, 2012).

Los estudios moleculares con aislados de *G. duodenalis* de rumiantes domésticos han confirmado la presencia, independientemente de la edad de los animales, de los genotipos A, B

y E, siendo este último el que se ha identificado con mayor frecuencia en el ganado bovino (Trout y col., 2004-2007; Mendonça y col., 2007; Santín y col., 2009; Nolan y col., 2010; Dixon y col., 2011) y ovino (Ryan y col., 2005; Castro-Hermida y col., 2006b; Santín y col., 2007; Geurden y col., 2008; Gómez-Muñoz y col., 2009; Robertson y col., 2010). Por el contrario, el genotipo B solo se ha detectado en casos muy puntuales (Coklin y col., 2007, 2009; Ng y col., 2011a) e incluso Aloisio y col. (2006) han asociado la presencia de este genotipo con síntomas clínicos severos en corderos de 30-90 días de edad.

Aunque *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. son parásitos comúnmente identificados en los rumiantes domésticos y en el hombre, en los últimos años se han incrementado los estudios de investigación de ambos enteropatógenos en las especies de animales silvestres. Concretamente, el corzo (*Capreolus capreolus*) y el jabalí (*Sus scrofa*) pueden actuar como reservorios de ambos protozoos para los animales domésticos y el hombre; asimismo, podrían contribuir a la contaminación de las aguas superficiales por estos parásitos (Hamnes y col., 2006b; Paziewska y col., 2007; Feng, 2010).

La prevalencia de ambas infecciones detectadas en estos animales son menores que las reportadas para las ganaderías bovina y ovina. Así, diversos estudios epidemiológicos realizados en corzos han mostrado prevalencias de la cryptosporidiosis que fluctuaron entre 1,9%-9,1% (Korshlom y Henriksen, 1984; Paziewska y col., 2007), mientras que en jabalíes estos valores fueron ligeramente superiores y oscilaron entre 5,4%-16,5% (Atwill y col., 1997; Navarro-i-Martínez y col., 2011; Němejc y col., 2011). Los estudios moleculares con aislados de *Cryptosporidium* spp. de corzos han revelado la presencia de *C. parvum*, *C. ubiquitum* y el genotipo de ciervo (Perz y Leblanc, 2001; Feng y col., 2007a; Feng, 2010; Robinson y col., 2011). En los jabalíes también se ha descrito la presencia de *C. parvum* además de *C. suis* y el genotipo porcino tipo II (Atwill y col., 1997; Navarro-i-Martínez y col., 2003; Němejc y col., 2011).

Los estudios epidemiológicos sobre la infección por *G. duodenalis* en corzos y jabalíes han mostrado prevalencias que oscilaron entre 1,7%-24,0% (Pavlásek y col., 1993; Atwill y col., 1997; Beck y col., 2011). Además, en un amplio estudio epidemiológico realizado por Hamnes y col. (2006b) en diferentes cérvidos –corzo (*Capreolus capreolus*), alce (*Alces alces*), ciervo común (*Cervus elaphus*) y reno (*Rangifer tarandus*)– se comprobó que en estas cuatro especies animales, los valores de prevalencia de *G. duodenalis* (1,7%-15,5%) fueron ligeramente más altos que los obtenidos para *Cryptosporidium* spp. (0%-6,2%). Sin embargo, otros autores observaron un mayor predominio de *Cryptosporidium* spp. que de *G. duodenalis* en ciervos de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y en renos (Deng y Cliver, 1999; Rickard y col., 1999; Siefker y col., 2002).

Los escasos estudios moleculares que se han llevado a cabo en aislados quísticos procedentes de corzos, confirman la presencia de los genotipos A, B y E en estos animales (Trout y col., 2003; van der Giessen y col., 2006; Robertson y col., 2007; Beck y col., 2011; Ng y col., 2011b). Sin embargo, apenas existe información sobre los genotipos responsables de la infección en jabalíes. Destaca un trabajo realizado en Croacia por Beck y col. (2011) en el que solo fueron capaces de identificar en un jabalí el genotipo A (subtipo A-III) de *G. duodenalis*.

#### 2.1.2. En el hombre

La cryptosporidiosis y la giardiosis constituyen uno de los problemas más importantes de salud pública a nivel mundial. De hecho, en países en vías de desarrollo ambas enfermedades afectan fundamentalmente a la población infantil, impactando negativamente en su crecimiento y desarrollo, por este motivo, en el año 2004 la Organización Mundial de la Salud (OMS) las incluyó en un grupo de enfermedades denominado *Neglected Diseases Initiative* y que por tanto, necesitan un enfoque específico para su comprensión y para el desarrollo de estrategias profilácticas (Savioli y col., 2006). Además, debido al carácter oportunista de *Cryptosporidium* spp., se considera uno de los agentes responsables de síndromes diarreicos graves en personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En países industrializados, el empleo de terapias antirretrovirales en personas afectadas por el SIDA ha reducido la prevalencia de la cryptosporidiosis, así como la gravedad y duración de las manifestaciones clínicas. Sin embargo, los numerosos brotes hídricos de ambas parasitosis descritos en estos países no sólo han provocado una alarma social sino que han tenido un fuerte impacto económico, especialmente en el caso de la cryptosporidiosis (Ives y col., 2001; Zardi y col., 2005; Huang y White, 2006; Nichols, 2008; Cacciò y Sprong, 2011).

En relación con la importancia de la cryptosporidiosis en el hombre, hemos de señalar que el estado inmunológico es uno de los factores determinantes de la gravedad y duración de los síntomas clínicos. Así, en personas inmunocompetentes, la enfermedad es autolimitada y cursa con diarrea leve a moderada, por lo que en la mayoría de los casos no precisa tratamiento farmacológico y suele ser suficiente la rehidratación oral. El período de prepatencia suele ser de 4-7 días, transcurridos los cuales se manifiesta un proceso diarreico que durante un máximo de siete días puede desencadenar entre 8-20 deposiciones diarias. Sin embargo, la excreción ooquistica puede alcanzar una duración superior a un mes después de la resolución de los síntomas. Además de la diarrea acuosa, también se han descrito otros síntomas como fatiga, malestar general, dolor abdominal, anorexia, náuseas, vómitos y fiebre leve. En individuos inmunocomprometidos, la cryptosporidiosis es especialmente prevalente en enfermos afectados por el SIDA. En este sentido, cabe señalar que la OMS establece que la

cryptosporidiosis con diarrea de más de un mes de duración y en enfermos con una infección por el VIH bien demostrada y no existiendo otras causas de inmunodeficiencia que puedan explicarla, es una de las situaciones clínicas diagnósticas de SIDA (Gatell y col., 1996). En este grupo de pacientes, la introducción de la terapia antirretroviral altamente activa (HAART) ha supuesto una considerable reducción de la mortalidad asociada a infecciones oportunistas así como un descenso en la prevalencia de la cryptosporidiosis (Stockdale y col., 2008). Además, esta parasitosis también puede producir un síndrome diarreico persistente e incluso crónico en personas sometidas a terapias inmunosupresoras o con un cierto grado de malnutrición. En estos casos, el volumen de deposiciones puede exceder los seis litros diarios, ocasionando pérdida de peso y deshidratación (Mathieu y col., 2004).

Los antibióticos paromomicina y azitromicina son los principios activos habitualmente utilizados en el tratamiento de la cryptosporidiosis humana, aunque como ocurre con los fármacos de uso veterinario, su eficacia frente al parásito ha sido parcial. Sin embargo, uno de los fármacos más prometedores en el tratamiento de la infección en el hombre es la nitazoxanida, antimicrobiano de amplio espectro con actividad antibacteriana y antiparasitaria. De hecho, el organismo encargado del control de alimentos y fármacos de Estados Unidos, *United States Food and Drug Administration*, aprobó la administración oral de la nitazoxanida para el tratamiento de procesos diarreicos causados por especies de *Cryptosporidium* en niños de 1-11 años de edad (Gargala, 2008; Stockdale y col., 2008).

Respecto a la importancia de la giardiosis en el hombre, hemos de señalar que la gravedad y duración de los síntomas clínicos también dependen de factores individuales de la respuesta inmunitaria. La infección puede ser aguda o crónica y sus efectos clínicos varían desde una parasitosis sintomática hasta una asintomática, especialmente esta última en individuos inmunocompetentes. El período de patencia es muy variable, puede ser tan breve como siete días, o tan prolongado como 45 días. Su duración depende fundamentalmente del estado inmunológico del hospedador (Adam, 2001). La giardiosis sintomática es consecuencia de los trastornos funcionales que pueden producir los trofozoítos en la mucosa del duodeno y del yeyuno (Cacciò y Sprong, 2011).

A diferencia de la cryptosporidiosis, existen diversos principios activos eficaces en el tratamiento de la giardiosis; así, destacan el grupo de moléculas pertenecientes a los benzimidazoles –albendazol y mebendazol–; los nitroimidazoles –metronidazol y tinidazol– y los nitrofuranos –furazolidona– (Gardner y Hill, 2001; Petri, 2005).

Por otra parte, los valores de prevalencia obtenidos en estudios epidemiológicos son variables en función de diversos factores. Generalmente, se considera que la cryptosporidiosis y la giardiosis son más frecuentes en países en vías de desarrollo que en los industrializados,

más común en niños que adultos y que el contacto con animales desempeña un papel importante en la etiología de estas parasitosis en el hombre en países desarrollados. La mayor prevalencia en países en vías de desarrollo justifica la consideración de ambas enfermedades como una causa importante de la diarrea del viajero (Gascón, 2006; Nichols, 2008).

En países desarrollados se han señalado valores de prevalencia de la cryptosporidiosis que oscilaron entre 2,0%-37,3%, correspondiendo los valores más bajos a personas inmunocompetentes y los más altos a pacientes seropositivos al VIH o inmunocomprometidos (Aspöck y Hassl, 1990; Matos y col., 1998; Dillingham y col., 2002; Glaeser y col., 2004; Hörman y col., 2004; Yoder y Beach, 2007; CDC, 2008; Snel y col., 2009; Yoder y col., 2010). En el año 2009 se denunciaron en Europa una media de 2,74 casos por cada 100.000 habitantes, la mayoría niños con edades comprendidas entre 0-4 años, siendo el país que ha presentado un mayor número de casos Irlanda seguido del Reino Unido y Bélgica (Davies y col., 2009; ECDC, 2011).

El primer caso diagnosticado en España de cryptosporidiosis humana fue en 1984 en una guardería en Barcelona en la que se detectó una prevalencia del 81,0% en niños con gastroenteritis (Serra y col., 1984). En la década de los años 80, se diagnosticó en distintas zonas de nuestro país, principalmente en población infantil detectándose prevalencias del 0,5% observada en Galicia (Villacorta Martínez de Maturana, 1989); 3,0% en Aragón (Clavel-Parrilla y col., 1987) o un 8,2% detectada en Cataluña (Portús y col., 1985). Entre 1990 y 1999 se diagnosticó la cryptosporidiosis en niños asintomáticos y en pacientes VIH-positivos (García-Rodríguez y col., 1990; García-Martos y col., 1992; Alonso-Sanz y col., 1995; Clavel y col., 1996; Rodríguez-Hernández y col., 1996; del Águila y col., 1997; Moles y col., 1998). En 1997 se diagnosticó un brote de cryptosporidiosis en un colegio de Andalucía en el cual se detectó una prevalencia del 33,0% y se confirmó que la causa del brote había sido el agua de bebida (Centro Nacional de Epidemiología, 2003). Desde el año 2000 y hasta la fecha, no solo se han detectado numerosos casos nuevos, sino que también se ha investigado el origen de los brotes. Así, Rodríguez-Salinas Pérez y col. (2000) detectan una prevalencia del 38,0% en una guardería en Madrid, confirmando que la causa de la infección había sido una avería en la red de suministro de agua. Posteriormente, se reportó una prevalencia del 6,3% en un grupo de personas que habían bebido agua no tratada de un pozo situado en un área recreativa y próximo a una explotación ganadera (Centro Nacional de Epidemiología, 2003). En este mismo año, se denunció un brote en un hotel de las Islas Baleares en el que se infectaron un total de 391 personas lo que representó el 19,8% de las plazas ocupadas en el hotel en ese momento, confirmándose que el mecanismo de transmisión había sido a través del agua de la piscina (Centro Nacional de Epidemiología, 2003).

Otro caso interesante ha sido reportado por Gómez-Couso y col. (2004b) quienes detectaron una prevalencia de la cryptosporidiosis del 47,0% en una guardería en Galicia. Los autores confirmaron que el mecanismo de transmisión había sido el agua de bebida, contaminada con ooquistes de *C. hominis*, como consecuencia de diversos problemas en la red de suministro.

Por otra parte, en países desarrollados existen también numerosos casos de giardiosis en el hombre y generalmente, los datos reportados de prevalencia de esta enfermedad han sido superiores en comparación con los publicados para la cryptosporidiosis. No obstante, los porcentajes de prevalencia pueden fluctuar entre un 4,0%-50,0% ya que estos valores, al igual que en la cryptosporidiosis, se alcanzan en función de la ubicación geográfica de la población, técnica utilizada para el diagnóstico, factores socio-sanitarios, edad, estado inmunológico, estacionalidad o grupos de riesgo, entre otros. Además, es posible que haya subestimaciones de la misma o resultados que induzcan a error por la excreción intermitente de quistes o la no detección de los mismos cuando se examina una sola muestra de heces (Cotte y col., 1993; Brandonisio y col., 1999; Hoque y col., 2004; Hörman y col., 2004; Crotti y col., 2005; Almeida y col., 2006; Giangaspero y col., 2007; Bajer, 2008; Davies y col., 2009; Geurden y col., 2009; Sagebiel y col., 2009; Snel y col., 2009; ECDC, 2011). En el año 2009 se denunciaron en Europa una media de 5,6 casos por cada 100.000 habitantes, la mayoría niños con edades comprendidas entre 0-4 años, siendo el país que ha presentado un mayor número de casos Bulgaria seguido de Estonia y Suecia (Davies y col., 2009; ECDC, 2011).

En España, *G. duodenalis* es uno de los parásitos más frecuentemente identificado en población infantil. Los primeros casos documentados en nuestro país fueron en la década de los años 70. Así, López Brea y col. (1982), en un estudio realizado entre los años 1978-1981, detectaron una prevalencia del 10,4% en muestras de niños analizadas en el servicio de microbiología del hospital Ramón y Cajal de Madrid. Posteriormente, se han diagnosticado numerosos casos en diversas zonas de la geografía española, detectándose prevalencias comprendidas entre 10,9%-27,1% en Cataluña (Portús y Prats, 1981; Serra y col., 1987); 23,2% en Castilla-La Mancha (Vasallo Matilla y col., 1982); 16,1% en Canarias (Valladares y col., 1983); 7,4% en el País Vasco (Goiriena de Gandarias y col., 1983); 9,6% en Castilla y León (García-Rodríguez y col., 1985, 1988); 56,7% en Extremadura (Vasallo Matilla y Jimeno Ortiz, 1985); 8,7% en Galicia (Ares-Mazás y col., 1987); 13,9% en Madrid (Castaño-Pascual y col., 1988); o entre un 2,7%-26,8% en Andalucía (Díaz y col., 1988; Fernández García y Aguilar Cano, 1988; García-López y col., 1989; García Martos y col., 1989). Hasta la fecha, los valores de prevalencia de la giardiosis se han mantenido respecto a los publicados en los años 80. Así, varios estudios muestran valores que fluctúan entre 8,4%-28,5% (Pedraza-Dueñas y col., 1994;



Rodríguez-Hernández y col., 1996; del Águila y col., 1997; Manzardo y col., 2008; Monge-Maillo y col., 2009). Estos porcentajes podrían ser debidos a la importancia que ha adquirido en los últimos años la transmisión hídrica de esta enfermedad.

Por otra parte, en los países en vías de desarrollo la cryptosporidiosis y la giardiosis pueden considerarse enfermedades endémicas, representando uno de los mayores problemas de salud pública en regiones de África, Asia y América Latina (OMS, 1997; Lane y Lloyd, 2002; Smith y Corcoran, 2004). En África se han llevado a cabo diversos estudios epidemiológicos en personas inmunocompetentes; concretamente, en la región subsahariana la prevalencia de la cryptosporidiosis en niños sintomáticos oscila entorno al 32,0% (Moodley y col., 1991; Gatei y col., 2006; Siwila y col., 2011) mientras que en Egipto se ha observado un valor medio del 47,0% en adultos asintomáticos (Youssef y col., 2008). Respecto a la giardiosis también se han publicado prevalencias altas en este continente. Así, Siwila y col. (2011) realizaron un estudio de un año de duración en cuatro guarderías de Zambia obteniendo una prevalencia que osciló entre 29,0%-75,0%. Otras investigaciones llevadas a cabo en población infantil y en adultos inmunocompetentes muestran valores de prevalencia de la giardiosis entre 30,0%-53,2% (El Guamri y col., 2009; Lalle y col., 2009; Jhonston y col., 2010; Abd El Kader y col., 2012). Sin embargo, en adultos inmunocomprometidos y en niños VIH-positivos, las prevalencias de ambas parasitosis han sido muy variables, fluctuando entre un 13,0%-73,6% (Cegielski y col., 1999; Endeshaw y col., 2004; Houpt y col., 2005; Tumwine y col., 2005; Gbakima y col., 2007; Akimbo y col., 2010; Babatunde y col., 2010).

En Asia también se han realizado numerosos estudios de la cryptosporidiosis y de la giardiosis en personas inmunocompetentes y se ha comprobado que ambas enfermedades predominan de manera significativa en la población infantil respecto a la población adulta. Los valores de prevalencia publicados por diversos autores oscilan entre el 25,0%-73,4% (Mirzaei, 2007; Natividad y col., 2008; Yakoob y col., 2010; Ranjbar-Bahadori y col., 2011). No obstante, en individuos inmunocomprometidos, se ha observado un predominio de la cryptosporidiosis respecto a la giardiosis. Además, las prevalencias mostradas han sido inferiores al 20,0% y al 8,0% para *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*, respectivamente (Mohandas y col., 2002; Zali y col., 2004; Guk y col., 2005; Zaidah y col., 2008; Daryani y col., 2009; Lim y col., 2011).

En América Latina se han llevado a cabo varios estudios epidemiológicos de estas enfermedades en individuos inmunocompetentes, observándose que los valores de prevalencia obtenidos para *Cryptosporidium* spp., han sido inferiores a los detectados para *G. duodenalis*. Así, numerosos autores han indicado que la prevalencia de la cryptosporidiosis fluctúa entre un 10,0%-35,7% (Reinthal y col., 1988; Cordova y col., 2006; Carvalho-Costa y col., 2007; Muñoz-Antoli y col., 2011) mientras que los valores de prevalencia de la giardiosis oscilan entre



19,5%-40,0% (Chaves y col., 2007; Pérez-Cordón y col., 2008; Barreto y col., 2010). Por el contrario, se detectaron mayores prevalencias de la cryptosporidiosis que de la giardiosis en individuos inmunocomprometidos o seropositivos al VIH (Cama y col., 2003; Flórez y col., 2003; Gonçalves y col., 2009).

Por otra parte, estudios moleculares realizados por diversos autores han confirmado que cinco especies de *Cryptosporidium* son las responsables de los casos de cryptosporidiosis en el hombre –*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* y *C. canis*– (Xiao y Feng, 2008). Aunque más del 90,0% de los casos están producidos por *C. hominis* y/o *C. parvum*, existen determinadas áreas geográficas en las que se ha comprobado que la prevalencia de la cryptosporidiosis causada por *C. meleagridis* es tan elevada como la producida por *C. parvum* (Cama y col., 2007, 2008). Se han diagnosticado también otras especies de *Cryptosporidium* en el hombre –*C. andersoni*, *C. bailey*, *C. cuniculus*, *C. fayeri*, *C. muris*, *C. suis*, *C. ubiquitum*– aunque su detección se ha limitado a casos aislados. Además, se han descrito diversos genotipos que originalmente habían sido observados en varias especies animales como el caballo, la mofeta, el mono o la ardilla (Robinson y col., 2008; Xiao y Feng, 2008; Xiao y Ryan, 2008; Waldron y col., 2010; Xiao, 2010). *C. hominis* es la especie más frecuentemente identificada en países como Australia, Canadá, España, Estados Unidos, Holanda y Japón que causa aproximadamente el 70,0% de los casos de cryptosporidiosis, mientras que *C. parvum* predomina en lugares como Francia, Italia, Nueva Zelanda o Portugal (Guyot y col., 2001; Learmonth y col., 2004; Xiao y Ryan, 2004; Llorente y col., 2007; ten Hove y col., 2007). En Inglaterra y Gales estas dos especies son responsables de prácticamente la totalidad de los casos de cryptosporidiosis, siendo *C. hominis* la especie más frecuente en niños entre 0-1 año de vida y en individuos entre 30-40 años, mientras que *C. parvum* predomina en todos los demás grupos de edad (Chalmers y col., 2009). En estos dos países también se han descrito casos de infecciones causadas por *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis* y *C. ubiquitum* (McLaughlin y col., 2000; Pedraza-Díaz y col., 2001a,b; Leoni y col., 2006; Chalmers y col., 2011).

En países en vías de desarrollo como la India, Tailandia, Perú, Sudáfrica, Kenia, Malawi o Egipto, se comprobó que *C. hominis* es la especie responsable del 70,0%- 90,0% de los casos de cryptosporidiosis en el hombre (Gatei y col., 2006; Samie y col., 2006; Morse y col., 2007; Cama y col., 2008; Abd El Kader y col., 2012). No obstante, cabe señalar que tanto en países industrializados como en vías de desarrollo, se han descrito diferencias geográficas en la distribución proporcional de ambas especies –*C. hominis* y *C. parvum*– dentro de un mismo país. De hecho, diversos autores han comprobado que la prevalencia de *C. hominis* fue mayor en zonas urbanas, mientras que en zonas rurales predominó *C. parvum*, hallazgos que los autores relacionaron con la presencia de explotaciones ganaderas así como de viviendas

con suministros particulares de agua para consumo en estas zonas (Feltus y col., 2006; Llorente y col., 2007; Zintl y col., 2009). *C. meleagridis* es la tercera especie en importancia, siendo responsable de aproximadamente el 15,0% de los casos de cryptosporidiosis humana en países como Perú y Tailandia (Gatei y col., 2002; Cama y col., 2007, 2008). Asimismo, ha sido identificado también en personas inmunocompetentes en países industrializados como Canadá, España, Francia, Japón o República Checa (Llorente y col., 2007; Xiao y Ryan, 2008).

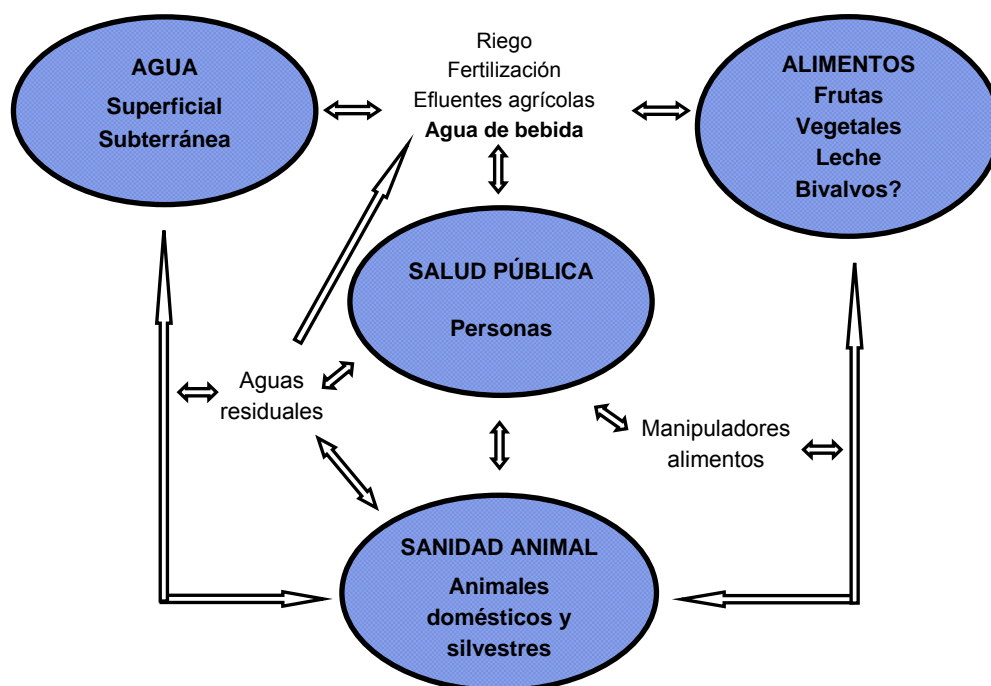
Son numerosos los estudios realizados en personas inmunocomprometidas o seropositivas al VIH, en las que también se comprobó que *C. hominis* y *C. parvum* son las especies responsables de la cryptosporidiosis tanto en países industrializados (Sulaiman y col., 1998; Morgan y col., 2000; Guyot y col., 2001; Alves y col., 2003; Llorente y col., 2007) como en vías de desarrollo (Lim y col., 2011). En estos hospedadores, la tercera especie más frecuentemente identificada ha sido *C. meleagridis* seguida en cuarto lugar por *C. felis* (Morgan y col., 2000; Guyot y col., 2001; Alves y col., 2003; Matos y col., 2004). Además, se han publicado casos de infecciones causadas por *C. muris*, *C. canis* y *C. suis* en países como Jamaica (Gatei y col., 2008), Perú (Cama y col., 2007), India (Muthusamy y col., 2006) o Tailandia (Gatei y col., 2002; Tiangtip y Jongwutiwes, 2002).

La giardiosis en el hombre está causada mayoritariamente por el genotipo A seguido del genotipo B de *G. duodenalis* (Thompson, 2000; Lim y col., 2011; Wielinga y col., 2011). El genotipo A se ha diagnosticado con mayor frecuencia en diversos países como Estados Unidos y Canadá (van Keulen y col., 2002), Italia (Lalle y col., 2005), México (Eligio-García y col., 2005) o Etiopía (Gelanew y col., 2007). El genotipo B también se ha identificado en numerosos países tanto industrializados como en vías de desarrollo; por ejemplo, Australia (Read y col., 2004; Yang y col., 2010), Reino Unido (Cacciò y col., 2005), España (Sahagún y col., 2008; Goñi y col., 2010), Albania (Berrilli y col., 2006), Malasia (Mohammed Mahdy y col., 2009), Nepal (Singh y col., 2009), Filipinas (Yason y Rivera, 2007), Turquía (Aydin y col., 2004) o en India y en Perú (Sulaiman y col., 2003). Diversos autores han realizado estudios con el fin de relacionar la presencia de manifestaciones clínicas con el genotipo A o B de *G. duodenalis*; sin embargo, los resultados publicados son contradictorios. Así, Homan y Mank (2001) en un trabajo llevado a cabo en 18 pacientes holandeses observaron que el genotipo A se detectó únicamente en individuos con episodios de diarrea intermitente, mientras que el genotipo B estuvo presente en pacientes con diarrea aguda o persistente. Por el contrario, en otro estudio llevado a cabo en niños menores de cinco años en Australia, los autores demostraron que el genotipo B fue más frecuente en asintomáticos, mientras que el genotipo A solo se identificó en niños con diarrea (Read y col., 2002), esta misma relación se observó en estudios realizados en España (Sahagún y col., 2008; Goñi y col., 2010).

## 2.2. Mecanismos de transmisión

La cryptosporidiosis y la giardiosis se pueden transmitir a través de numerosas vías, incluyendo el contacto directo o indirecto con personas infectadas (transmisión persona-persona) o animales (transmisión persona-animal o animal-animal), la ingestión de comida o agua contaminada (transmisión por alimentos y transmisión por agua de consumo o de recreo) y posiblemente a través del aire (Figura 3).

**Figura 3.** Diagrama representativo de las potenciales rutas de transmisión de la cryptosporidiosis y la giardiosis (Slifko y col., 2000; Hunter y Thompson, 2005; Monis y col., 2009).



Existen, además, diferentes aspectos que favorecen la difusión de ambas infecciones:

- i) los ciclos biológicos son monoxenos; ii) presencia de numerosos reservorios; iii) los hospedadores infectados pueden eliminar (oo)quistes masivamente ( $10^7 - 10^{10}$ ); iv) las formas de resistencia excretadas son directamente infectantes; v) los (oo)quistes de *Cryptosporidium* spp. y de *G. duodenalis* son muy resistentes en el ambiente; vi) las dosis infectantes son bajas [10 - 100 (oo)quistes]; vii) la principal ruta de transmisión es a través del agua y alimentos contaminados; viii) los (oo)quistes de *Cryptosporidium* spp. y de *G. duodenalis* resisten los procesos de depuración y potabilización de aguas y la acción de los desinfectantes habituales; y ix) no existe tratamiento eficaz contra la cryptosporidiosis (Thompson, 2000; Nichols, 2008).

Con el fin de determinar la dosis de ooquistes de *C. parvum* necesaria para producir la infección en el hombre, DuPont y col. (1995) infectaron un total de 29 voluntarios sanos con cantidades de ooquistes comprendidas entre treinta y un millón, obteniendo unos valores de dosis infectante ( $DI_{50}$ ) de 132 ooquistes. Sin embargo, en algunos casos se consiguió establecer la infección con dosis de 30 ooquistes. En otros estudios publicados la dosis infectante se estableció en 82 ooquistes, observándose una gran variabilidad en la virulencia en función de los distintos aislados de *C. parvum* utilizados (Okhuysen y col., 1999). La dosis infectante para *G. duodenalis* se estimó en 19-50 quistes para personas inmunocompetentes (Adam, 2001).

Por tanto, ambos protozoos son altamente infecciosos y cualquier persona puede ser susceptible de adquirir la infección. Sin embargo, existen una serie de factores de riesgo para el padecimiento de ambas parasitosis:

- ▶ Deficiencia inmunitaria.
- ▶ Niños menores de cinco años.
- ▶ Contactos zoonóticos por distintas actividades (educacionales, recreativas o profesionales).
- ▶ Exposición a aguas recreativas contaminadas o consumo de agua y alimentos tratados inadecuadamente.
- ▶ Viajeros desplazados a zonas endémicas.

Por otra parte, la contaminación ambiental con heces de animales parasitados desempeña un papel importante en la transmisión de la cryptosporidiosis y giardiosis animal. Esta contaminación está condicionada por una gran variedad de factores, entre los que destacan el número de hospedadores infectados y de las formas infectantes excretadas, las distintas prácticas agrícolas y ganaderas, además del clima e hidrogeología de la zona geográfica (Nichols, 2008). Las potenciales fuentes de infección, de ambas parasitosis, para los rumiantes domésticos son:

- ▶ Los rumiantes menores de un mes, especialmente cuando se mantienen en recintos comunes o permanecen en grupos al aire libre.
- ▶ Los animales adultos con infección subclínica.
- ▶ Diferentes animales domésticos o silvestres infectados.
- ▶ Portadores mecánicos como insectos, pájaros e incluso el hombre.
- ▶ Los alimentos y el agua, así como diversos utensilios empleados habitualmente en las explotaciones que hallan sido accidentalmente expuestos a contaminación fecal.

Existen referencias que confirman la transmisión de la infección al hombre a través del contacto con animales. Algunos autores sugieren el contacto directo con animales de compañía, principalmente en individuos inmunocomprometidos como factor de riesgo (Morgan y col., 2000; Thompson y col., 2008). Además, el contacto con terneros y corderos infectados podría favorecer la transmisión de ambas infecciones (Enríquez y col., 2001; Hunter y Thompson, 2005; Pritchard y col., 2007), sin olvidar que algunos insectos pueden actuar como vectores mecánicos (Huang y White, 2006).

Por otra parte, tanto los animales domésticos –incluso asintomáticos– como los salvajes, al infectarse pueden contaminar otras fuentes de transmisión, como el agua, mediante la eliminación de grandes cantidades de (oo)quistes al ambiente (Hancock y col., 2001; Castro-Hermida y col., 2007a,b; Méndez-Hermida y col., 2007b; Budu-Amoako y col., 2012).

La contaminación fecal del suelo y del agua superficial puede mediar el transporte de los (oo)quistes a los alimentos frescos y al agua de consumo o de recreo. La aplicación de abonos de origen animal –estiércol y/o purines– para fertilizar tierras agrícolas puede contribuir a esta contaminación ya que los agentes patógenos presentes en las heces de los animales pueden propagarse por el suelo o el agua, dispersión que se ve favorecida por la caída de precipitaciones y por la resistencia de los (oo)quistes a las condiciones ambientales (Barwick y col., 2003). Algunos autores confirman que las aves pueden participar de forma activa como contaminantes del suelo con (oo)quistes (Pagés-Manté y col., 2007; Majewska y col., 2009).

Hasta la fecha, son pocos los brotes epidémicos publicados originados a partir de alimentos contaminados. Sin embargo, se ha observado la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y de quistes de *G. duodenalis*, en diferentes fuentes alimentarias, tanto animales como vegetales. Se han detectado (oo)quistes en alimentos de consumo diario como frutas y verduras (Monge y Chinchilla, 1996; Ortega y col., 1997; Robertson y Gjerde, 2001b; Blackburn y col., 2006; Macarisin y col., 2010); asimismo, Harper y col. (2002) han identificado ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en leche no pasteurizada. Los productos de origen agroalimentario se pueden contaminar a través de diferentes vías, como son los manipuladores de alimentos, el agua de regadío contaminada y lugares de almacenamiento, procesado y distribución contaminados. Son probablemente, las características de humedad y temperatura las que favorezcan la supervivencia de ambas formas infectantes de estos enteropatógenos.

Se han detectado formas infectantes de estos protozoos en moluscos bivalvos como ostras, almejas, mejillones y berberechos (Tamburrini y Pozio, 1999; Freire-Santos y col., 2000b, 2001; Gómez-Bautista y col., 2000; Gómez-Couso y col., 2003, 2004a; Smith y col., 2007; Giangaspero y col., 2009). Además, Gómez-Couso y col. (2006b) han comprobado que en mejillones cocinados al vapor los ooquistes de *Cryptosporidium* permanecen infectantes. No

obstante, todavía no se conoce ningún caso confirmado de cryptosporidiosis o de giardiosis por consumo de estos moluscos.

Por otra parte, la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en el esputo de individuos inmunocomprometidos sugiere que la vía aerógena podría ser un mecanismo de transmisión (López-Vélez y col., 1995; Fayer y col., 2000a). Sin embargo, algunos autores consideran que la infección respiratoria en mamíferos se debe a una aspiración accidental del vómito o a una diseminación por vía sanguínea (Mascaró y col., 1994). No obstante, Lindsay y Blagburn (1990) indican que las aves pueden adquirir, con mayor frecuencia que los mamíferos, infecciones respiratorias de forma natural.

#### 2.2.1. El agua como vehículo de transmisión

La transmisión por el agua de consumo de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* está favorecida por el tamaño pequeño de los (oo)quistes y por la resistencia de las formas infectantes a los procesos convencionales aplicados en las estaciones de tratamiento de agua potable (ETAPs) (OMS, 2002; CDC, 2006; Carmena y col., 2007; Reynolds y col., 2008; Bajer y col., 2012). Los brotes epidémicos de la cryptosporidiosis y de la giardiosis ligados al consumo de agua de bebida, confirman la viabilidad de los (oo)quistes una vez han superado los procesos de potabilización.

Desde que Shaw y col. (1977) y D'Antonio y col. (1985) documentasen los primeros brotes hídricos de *G. duodenalis* y *C. parvum*, respectivamente y hasta la actualidad, se describieron a nivel mundial numerosos brotes asociados al empleo de aguas de consumo y recreacionales contaminadas (Smith y Grimason, 2003; Robertson y col., 2006a; Karanis y col., 2007; Nichols y col., 2009; Baldursson y Karanis, 2011; OMS, 2011b).

El mayor brote hídrico de cryptosporidiosis documentado ocurrió en Milwaukee (Estados Unidos) en el año 1993 y afectó aproximadamente a 403.000 personas (Mac Kenzie y col., 1994). La causa fue la contaminación del lago Michigan que abastecía a una de las plantas de potabilización de agua de dicha ciudad, además de un deficiente tratamiento que se confirmó por la alta turbidez que presentaba el agua. Las intensas precipitaciones que tuvieron lugar con anterioridad en la zona y el elevado censo de ganado bovino existente en las inmediaciones del lago se consideraron factores que contribuyeron al brote. Sin embargo, el análisis molecular de muestras fecales procedentes de pacientes afectados durante el brote, permitió identificar los ooquistes como pertenecientes a la especie *C. hominis*, sugiriendo que la contaminación tuvo un origen humano (Peng y col., 1997). El brote hídrico de giardiosis más importante se ha descrito en Bergen (Noruega) en el año 2004 y se infectaron entorno a 48.000 personas, de las cuales 2.500 tuvieron que recibir tratamiento médico (Nygård y col., 2006;

Robertson y col., 2006c). Como hemos comentado, en nuestro país se han documentado varios casos nuevos de ambas enfermedades en los últimos años, confirmándose que el mecanismo de transmisión había sido el agua de bebida contaminada con las formas infectantes de ambos enteropatógenos (Gómez-Couso y col., 2004b; Centro Nacional de Epidemiología, 2008, 2011; Navarro-i-Martínez y col., 2011).

La magnitud de un brote de cryptosporidiosis o de giardiosis, asociado al consumo de agua, estará determinada no solo por la eficacia del tratamiento de potabilización, sino también por los factores propios de ambos parásitos y del hospedador, representando lo que se conoce como dinámica de transmisión. La posibilidad de un brote hídrico en una determinada zona geográfica depende de varios factores:

- ▶ Número de formas parasitarias; viabilidad, infectividad y virulencia de las mismas.
- ▶ Número de hospedadores susceptibles expuestos, para dar lugar a una infección primaria.
- ▶ Número de hospedadores en contacto con casos de infección primaria que puedan sufrir una infección secundaria, amplificando la incidencia.
- ▶ Condiciones climatológicas que provoquen una elevada turbidez en las aguas superficiales.
- ▶ Fallos en la red de distribución de aguas.

En los últimos años, los brotes epidémicos asociados a aguas superficiales, subterráneas y principalmente de recreo, también han afectado a varias personas (Hancock y col., 1998; Hunter y Thompson, 2005; Gaut y col., 2008). La frecuente contaminación fecal, las grandes aglomeraciones de bañistas, la resistencia al cloro así como la baja dosis infectante de ambos parásitos, hacen que las piscinas constituyan la fuente idónea para la transmisión de la cryptosporidiosis y la giardiosis. No obstante, aunque la mayoría de brotes epidémicos por agua de recreo han estado asociados a las piscinas, también existen datos en lagos, ríos, fuentes y parques acuáticos (Fayer, 2004; Craun y col., 2005; Sunderland y col., 2007; Baldursson y Karanis, 2011). A diferencia de las piscinas, las áreas recreativas naturales pueden contener 1.000 veces más carga parasitaria en el sedimento que el agua superficial (Indest, 2003; Yoder y col., 2004; Brookes y col., 2005). La resuspensión del sedimento contribuirá al aumento de la concentración de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en estas aguas (Brookes y col., 2004; Giangaspero y col., 2007).

El mayor brote hídrico de cryptosporidiosis y de giardiosis asociado a áreas recreativas ocurrió a través del agua de las piscinas en un parque acuático en Georgia (Estados Unidos) en el año 1995 y afectó aproximadamente a 5.449 personas (Beach y col., 1996; Levy y col., 1998). Se confirmó la presencia de *C. hominis* y *G. duodenalis* tanto en el agua de las piscinas como en las personas infectadas. Cabe destacar, dos brotes de cryptosporidiosis que



ocurrieron también a través del agua de las piscinas en un hotel en Palma de Mallorca (España) en los años 2000 y 2003, afectando a 22 y 391 turistas, respectivamente. En ambos brotes, se confirmó la presencia de *C. hominis* y *C. parvum* en el agua de las piscinas y en los individuos afectados (Cartwright y Colbourne, 2002; Galmes y col., 2003).

Por otra parte, el hallazgo de (oo)quistes de *Cryptosporidium* spp. y de *G. duodenalis* en los efluentes de estaciones depuradoras de agua residual (EDARs) evidencia el alto grado de contaminación hídrica existente (Cacciò y col., 2003; Gómez-Couso y col., 2005; Ruecker y col., 2007; Cheng y col., 2009; Smith y Nichols, 2010).

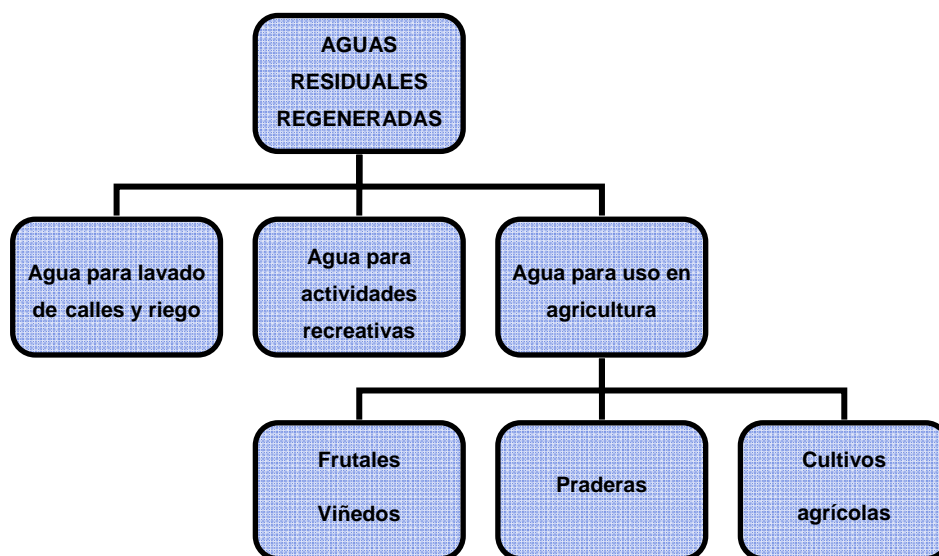
La eliminación de los efluentes de las EDARs a cuencas hidrográficas o al mar necesita cada vez más garantías especiales debido al peligro que puede tener en sanidad animal y humana. Es necesario destacar que la legislación española es muy laxa en materia de control y vigilancia de la calidad de las aguas superficiales y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico, principalmente en lo referido a las determinaciones microbiológicas. El hecho de que no se considere la necesidad de controlar ningún organismo parásito podría comprometer la salud animal y humana, principalmente si se tiene en cuenta que la legislación se aplica en materia de control y vigilancia de la calidad de las aguas continentales –zonas de baño, piscícolas y prepotables– como aguas residuales –vertidos– (BOE, núm. 77, de 29 de marzo de 1996; BOE, núm. 157, de 2 de julio de 2002; BOE, núm. 250, de 19 de octubre de 2006). Esta situación conlleva a que en los últimos años emerjan zoonosis de origen parasitario como la cryptosporidiosis y la giardiosis asociadas al agua y a los alimentos contaminados.

La reutilización de las aguas residuales procedentes de EDARs se ha intensificado en muchos países, sobre todo para usos agrícolas (Figura 4), por lo que necesita cada vez más garantías de control debido al riesgo que puede suponer para la sanidad animal y humana (Bukhari y col., 1997; Robertson y col., 2000, 2006b; Quintero-Betancourt y col., 2003; Di Giovanni y col., 2006; Lalancette y col., 2012). Concretamente, en España cada vez es más frecuente reutilizar las aguas residuales depuradas en el sector agroalimentario –especialmente en la fertilización agrícola– o como fuente de riego en áreas recreativas –parques públicos, zonas verdes o campos de golf–. Sin embargo, los procedimientos convencionales aplicados en las EDARs no inactivan de manera suficiente los microorganismos presentes en el agua y la inactivación de los (oo)quistes de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* es muy baja en estas depuradoras. En este sentido, diversos países han elaborado normativas, cada vez más exigentes, sobre las condiciones que deben cumplir los vertidos de aguas residuales depuradas al ambiente y también establecen criterios de calidad para la reutilización de estas aguas según sus usos. De hecho, se permiten reutilizar los efluentes de las EDARs siempre y cuando las aguas residuales depuradas hayan sido sometidas a un proceso de tratamiento



adicional que permite adecuar su calidad al uso al que se destinan. De esta forma, los principales objetivos de los tratamientos de regeneración de las aguas son eliminar la carga contaminante residual del efluente a regenerar y desinfectarlo completamente, a fin de inactivar los microorganismos patógenos presentes antes de su utilización; de manera que la aceptabilidad de las aguas regeneradas para un uso determinado depende de la calidad física, química, microbiológica y, principalmente, del riesgo potencial para la sanidad animal y la salud pública (Asano, 1991, 1998; Cotruvo y col., 2004; USEPA, 2004; OMS, 2006a; Rose, 2007).

**Figura 4.** Esquema del uso de las aguas residuales regeneradas.



#### 2.2.2. Importancia de los animales en la contaminación del agua

En general, las repercusiones epidemiológicas de la contaminación hídrica pueden adquirir enorme importancia ya que todos los hospedadores precisan del agua para su supervivencia, siendo un medio idóneo para la diseminación de los (oo)quistes de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*, de tal forma que una sola fuente contaminada puede infectar a un gran número de hospedadores.

Uno de los mayores retos del sector agropecuario es la disminución del impacto ambiental de las actividades productivas para garantizar la conservación de los recursos naturales así como proteger las fuentes de agua. En este contexto, los animales pueden contribuir directa o indirectamente a la contaminación de aguas superficiales. Sin embargo, esta contaminación ambiental está condicionada por una serie de factores, entre los que destacan; el número, el comportamiento y la actividad de los animales infectados –domésticos y silvestres–; las prácticas agrarias y ganaderas; el saneamiento de las granjas y el clima e

hidrografía de la zona. Los estudios epidemiológicos realizados demuestran el carácter cosmopolita de la cryptosporidiosis y de la giardiosis y se estiman unas prevalencias, en hospedadores animales, comprendidas entre 10,0%-90,0% dependiendo de la edad, signos clínicos, régimen de mantenimiento y número de muestras analizadas (Nichols, 2008; Geurden y Olson, 2011).

En los rumiantes domésticos, el número de (oo)quistes eliminados puede alcanzar valores medios comprendidos entre  $10^4$  –  $10^{10}$  (oo)quistes/gramo de heces durante el transcurso clínico de estas infecciones (Hill y col., 1990; Ortega-Mora y Wright, 1994; Nydam y col., 2001). Además, el ganado adulto puede eliminar al ambiente entre 2 millones y 16 billones de (oo)quistes/animal/día, por lo que la contribución de estos animales a la contaminación ambiental y en particular a las aguas superficiales podría ser importante en zonas ganaderas (Farizawati y col., 2005). En las explotaciones de ganado bovino y ovino, los adultos son los principales portadores asintomáticos representando una importante fuente de infección para los animales recién nacidos (Sánchez-Acedo y col., 1991b; Lorenzo-Lorenzo y col., 1993a; Requejo-Fernández y col., 1995; Ortega-Mora y col., 1999a,b; Fayer y col., 2000b; Castro-Hermida y col., 2007a). Sin embargo, la diseminación de las formas parasitarias de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* procedentes de los rumiantes domésticos podría tener mayor repercusión en sanidad animal que en salud pública. Así, los estudios realizados en Europa, Estados Unidos y Canadá han confirmado que en explotaciones de ganado bovino, tanto de aptitud lechera como cárnica, la mayoría de los casos de cryptosporidiosis neonatal se producen por la especie zoonótica *C. parvum*, mientras que *C. bovis* y *C. ryanae* desempeñan un papel poco relevante en este grupo de edad, siendo más frecuentes en terneros destetados y novillas. Asimismo, *C. andersoni* es la especie predominante en vacas mayores de dos años. Por tanto, aunque los animales adultos pueden excretar grandes cantidades de ooquistes, el ganado bovino no se puede considerar un reservorio zoonótico relevante tras el destete de los animales (Santín y col., 2008).

En el ganado ovino, no está confirmada la relación entre la distribución de las especies de *Cryptosporidium* y la edad, por lo que algunos autores sostienen que esta ganadería no es un importante reservorio zoonótico de esta parasitosis (Ryan y col., 2005), mientras que otros han propuesto que pueden albergar especies que son potencialmente infecciosas para el hombre, por lo que podrían ser considerados como reservorios con importancia en salud pública (Geurden y col., 2008; Mueller-Doblies y col., 2008).

Respecto al flagelado *G. duodenalis*, los estudios moleculares realizados en rumiantes domésticos confirman un predominio del genotipo E seguido de los genotipos zoonóticos A y B, detectándose en animales de todas las edades, por lo que el ganado bovino y ovino podrían

tener más relevancia en la transmisión de la giardiasis a los animales recién nacidos o adultos que al hombre (Trout y col., 2004-2007; Geurden y col., 2008).

Por otra parte, las especies de *Cryptosporidium* que se han identificado en las aguas superficiales son: *C. andersoni*, *C. baileyi*, *C. hominis*, *C. parvum* y *C. ubiquitum* así como los genotipos mofeta y rata almizclera (Smith y Nichols, 2010); mientras que para *G. duodenalis*, los genotipos que se han detectado son: A, B y E (Thompson, 2004; Almeida y col., 2010).

Diversos autores indican que la mayor concentración de (oo)quistes en aguas superficiales se detectó en zonas con alta influencia ganadera (Bodley-Tickell y col., 2002; Keely y Faulkner, 2008; Budu-Amoako y col., 2012). De hecho, la contaminación del agua con estiércol o purín ha sido confirmada en varios brotes hídricos (Risebro y col., 2007; Semenza y Nichols, 2007). La dispersión de los (oo)quistes en el ambiente y su transporte hasta las aguas superficiales puede suceder a través de diversas rutas:

- ▶ Contacto directo de los animales con el agua.
- ▶ Fugas o derrames de las fosas de almacenamiento.
- ▶ Aplicación de estiércol o purín a la tierra como fertilizante.
- ▶ Aguas de escorrentía procedentes de las explotaciones o de las tierras en las que se han esparcido los residuos de origen animal.
- ▶ Factores ambientales.

La gestión adecuada de los residuos ganaderos es fundamental para evitar la contaminación ambiental. Así, Sischo y col. (2000) comprobaron que el factor más importante en el aumento de la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en el agua superficial fue la frecuencia del esparcimiento del estiércol en los pastos. Además, las condiciones de almacenamiento de estos excrementos también influyen en la viabilidad de los organismos patógenos antes de su dispersión en el ambiente. De hecho, se ha comprobado que almacenar el estiércol en montículos al menos 70 días puede reducir la potencial infectividad de las formas parasitarias de *Cryptosporidium* spp. y de *G. duodenalis* (Olson y col., 1999; Jenkins y col., 2002).

El proceso de transporte de los (oo)quistes depende, fundamentalmente, de las aguas de escorrentía tanto de las explotaciones ganaderas como de las tierras abonadas. Diversos autores han observado un aumento de las concentraciones de ambas formas parasitarias en aguas superficiales coincidiendo con el período de partos y la época de abonado de las tierras (Ong y col., 1996; Farizawati y col., 2005; Keely y Faulkner, 2008; Robinson y col., 2011). En terrenos llanos y previamente abonados, se ha comprobado que tras el regadío, más del 70,0% de los ooquistes de *C. parvum* se pueden recuperar en una capa de dos centímetros de suelo,

mientras que en un terreno con una pendiente del 7,5%, se produce el arrastre de los ooquistes por las aguas de escorrentía (Mawdsley y col., 1996; Graczyk y col., 2000). El análisis de muestras de suelo extraídas de explotaciones de ganado bovino de aptitud lechera reveló la presencia de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en el 17,0% y 4,0%, respectivamente (Barwick y col., 2003). Determinados factores ambientales; por ejemplo, las fuertes lluvias, aumentan la frecuencia de los brotes de transmisión hídrica, esto es debido a la contaminación de las aguas superficiales por el arrastre de las formas parasitarias presentes en el suelo (Curriero y col., 2001; Kistemann y col., 2002). Estas precipitaciones van a disminuir la velocidad de sedimentación de los (oo)quistes debido al aumento de la velocidad de los cursos de agua, favoreciendo así una mayor dispersión (Ono y col., 2001; Butkus y col., 2003).

Por otra parte, los países de la Unión Europea han marcado diversas directrices con el fin proteger las aguas de la posible contaminación producida por la actividades agropecuarias. Sin embargo, estas medidas están enfocadas hacia la contaminación producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias y no reflejan la necesidad de controlar ningún microorganismo que pueda suponer un riesgo para la sanidad animal y/o la salud pública. Estas medidas se refieren a la supervisión de las aguas superficiales y subterráneas, la designación de zonas vulnerables, la elaboración de códigos de buenas prácticas agrarias, la adopción de programas de acción y la evaluación de las acciones llevadas a cabo (Directiva Europea 91/676/CEE del Consejo, de 12 de diciembre de 1991; corrección de errores de 16 de abril de 1993; BOE, núm. 61 de 11 de marzo de 1996; DOG, núm. 181, de 17 de septiembre de 1999).

La contribución de los animales silvestres a la contaminación de las aguas superficiales también podría ser importante ya que algunas especies de fauna salvaje son susceptibles a la infección por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*. La intensificación de la agricultura conduce a la fragmentación de los hábitats naturales, aumentando las áreas de cultivo y facilitando la presencia de algunas especies cinegéticas como el corzo y el jabalí en estas zonas e incluso en las proximidades de las explotaciones ganaderas (Robinson y Sutherland, 2002; Delahay y col., 2007; Pinna y col., 2007; Abbas y col., 2011; Amici y col., 2011). Como se ha mencionado en el apartado 2.1.1. son escasos los estudios de caracterización molecular realizados para la identificación de especies y/o genotipos de *Cryptosporidium* y *G. duodenalis* en estos animales. En los corzos, se han identificado *C. parvum*, *C. ubiquitum* y el genotipo de ciervo (Robinson y col., 2011), mientras que en los jabalíes se han identificado las especies *C. parvum* y *C. suis*, además del genotipo porcino tipo II (Atwill y col., 1997; Navarro-i-Martínez y col., 2003; Němejc y col., 2011). Respecto a *G. duodenalis*, en estos animales solo ha sido identificado el genotipo A (van der Giessen y col., 2006; Beck y col., 2011).

Otras especies cinegéticas de interés y que posiblemente contribuyan a la contaminación de las aguas superficiales son el conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus*) y la perdiz roja (*Alectoris rufa*). Estos animales se pueden observar con frecuencia en las inmediaciones de las explotaciones ganaderas. El conejo de monte es el reservorio principal de la especie zoonótica *C. cuniculus* (Robinson y col., 2010), mientras que la perdiz roja puede contribuir también a la contaminación ambiental con *C. meleagridis* (Pagés-Manté y col., 2007), considerándose actualmente parásito emergente (Xiao y col., 2004). Además, se ha observado la presencia del genotipo B de *G. duodenalis* en el conejo de monte (Sulaiman y col., 2003; Zhang y col., 2012).

Los animales silvestres semi-acuáticos también pueden acceder y contaminar las aguas superficiales con estos protozoos. De hecho, se han identificado ambos parásitos en diversos roedores con hábitos acuáticos como la rata almizclera (*Ondatra zibethicus*), el castor americano (*Castor canadensis*), el castor europeo (*Castor fiber*), el coipú (*Myocastor coypus*) y mustélidos como la nutria (*Lutra lutra*) (Karanis y col., 1996; Dunlap y Thies, 2002; Heitman y col., 2002; Fayer y col., 2006a; Méndez-Hermida y col., 2007b; Bajer y col., 2008).

Las aves migratorias contribuyen a la contaminación hídrica por ambos protozoos. *Cryptosporidium* spp. y/o *Giardia* spp. han sido detectados en diferentes aves acuáticas como el ganso (*Anser anser*), el ánade real (*Anas platyrhynchos*), la focha común (*Fulica atra*), el cormorán negro (*Phalacrocorax carbo*) y la garza real (*Ardea cinerea*), entre otras. En estos animales se han detectado dos especies de *Cryptosporidium* –*C. parvum* y *C. hominis*– así como los genotipos A y B de *G. duodenalis* (Graczyk y col., 1996, 1997, 2008; Upcroft y col., 1998; Zhou y col., 2004b; Majewska y col., 2009; Plutzer y Tomor, 2009).

### 2.3. Resistencia de las formas infectantes

A pesar de los avances en el conocimiento de la biología, inmunología, genética y epidemiología de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp., la resistencia a las medidas de control ambientales y a numerosos agentes quimioterapéuticos, especialmente *Cryptosporidium* spp., hacen que ambos enteropatógenos sigan representando un tema de interés para la sanidad animal y humana. Estudios bioquímicos de las formas infectantes de *C. parvum* demostraron que la pared ooquistica presenta numerosos puentes bisulfito, confiriéndole una elevada resistencia a las condiciones ambientales (Mitschler y col., 1994). Se considera que la solidez de los quistes de *G. duodenalis* es debida a la naturaleza filamentosa de la porción externa de la pared, compuesta por proteínas e hidratos de carbono principalmente de un homopolímero de N-acetil galactosamina (Adam, 2001; Gerwig y col., 2002). La temperatura es uno de los factores más críticos que afectan a la viabilidad e infectividad de los (oo)quistes. Ambos protozoos pueden sobrevivir en las aguas superficiales durante meses a temperaturas que

oscilan entre 4°C-25°C (Fayer, 1994; Olson y col., 1999; Jenkins y col., 2002). Sin embargo, valores de temperatura superiores afectan negativamente a la supervivencia de las formas infectantes de *Cryptosporidium* spp. y de *G. duodenalis*. De hecho, se ha comprobado que tras la exposición de los ooquistes de *C. parvum* a temperaturas de 64°C durante cinco minutos estos pierden su capacidad infectante en ratones recién nacidos (Fayer, 1994), mientras que los quistes de *G. duodenalis* a 37°C no sobreviven más de cuatro días (deRegnier y col., 1989). De igual forma, las temperaturas de congelación también alteran la infectividad de estos patógenos, mientras que los ooquistes sometidos a temperaturas de -20°C, -10°C y -5°C permanecen viables durante ocho horas, una semana y dos meses respectivamente, la congelación a -70°C inactiva inmediatamente los ooquistes de *C. parvum*, incluso con crioprotectores (Robertson y col., 1992; Fayer y col., 1998b). El efecto de las condiciones atmosféricas existentes en algunas regiones del mundo; por ejemplo, en la península escandinava, también podrían provocar la ruptura de los (oo)quistes en las aguas superficiales (Robertson y Gjerde, 2004).

El tipo de sustrato sobre el que se encuentran los (oo)quistes también influye en su supervivencia (Kato y col., 2002; Hijnen y col., 2005). Así, Robertson y col. (1992), mediante ensayos de permeabilidad a colorantes vitales, demostraron que entre un 0%-59,0% de los ooquistes de *C. parvum* sobrevivieron después de permanecer 178 días en heces humanas conservadas a 4°C. De igual forma, comprobaron que un 39,0% de los ooquistes de origen bovino se mantuvieron viables en heces de terneros a 4°C después de 176 días. Deng y Cliver (1992) alcanzaron valores de inactivación del 90,0% de los quistes de *G. duodenalis* tras haber permanecido 129 días en una mezcla de heces de origen humano y porcino a una temperatura de 5°C. Además, Jenkins y col. (1999) demostraron que la proporción de ooquistes potencialmente infectantes varía notablemente según el tipo de suelo y/o residuo animal en el que se mantienen. Por otra parte, Barwick y col. (2003) al analizar muestras de suelo recogidas en granjas de ganado bovino, comprobaron un menor número de ambas formas parasitarias en los suelos de pH neutro o básico. Li y col. (2005) indican que los procesos fermentativos que tienen lugar durante el almacenamiento del estiércol podrían reducir la potencial infectividad de ambos patógenos.

La salinidad es otro factor físico que puede alterar las formas de resistencia de ambos parásitos. Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. también sobreviven en agua de mar durante largos períodos de tiempo, manteniéndose viables tras permanecer a 4°C y en oscuridad durante 35 días (Robertson y col., 1992). Estudios de infectividad en ratones han demostrado que las mayores tasas de infección se producen cuando los ooquistes se mantienen a bajas salinidades durante cortos períodos de tiempo (Fayer y col., 1998b). No obstante, se ha visto

que los ooquistes pueden mantener su infectividad hasta períodos de un año en agua de mar mantenida a una temperatura de 6°C-8°C con una oxigenación moderada (Tamburrini y Pozio, 1999). Freire-Santos y col. (1999, 2000a) valoraron de forma conjunta los efectos de la salinidad, temperatura y el tiempo sobre la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* en el medio acuático, comprobando que la temperatura no es un factor limitante. Sin embargo, la salinidad, el tiempo y su interacción afectan significativamente a la infectividad de los ooquistes. Los autores demostraron que ooquistes mantenidos en agua de mar con una salinidad del 35‰ a una temperatura de 18°C durante 40 días fueron infectantes para ratones recién nacidos. Respecto al flagelado *Giardia* spp. no se ha determinado experimentalmente su supervivencia en el agua de mar, pero las infecciones en mamíferos marinos sugieren que son resistentes, por lo menos, a salinidades bajas (Fayer y col., 2004).

El grado de humedad también afecta a la supervivencia de las formas infectantes de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* (Dubey, 1993; Robertson y col., 2002). Concretamente, Robertson y col. (1992) comprobaron en varios aislados de *C. parvum* el efecto que tenía sobre estos la desecación y observaron que tras secarse una suspensión acuosa depositada en un portaobjetos mantenida a temperatura ambiente durante dos horas, solo un porcentaje muy bajo (3,0%) de los ooquistes permanecían viables, llegándose a la inactivación total al cabo de cuatro horas.

La exposición a la radiación solar también afecta a la viabilidad para un amplio número de microorganismos. Su efecto es debido a procesos ópticos y térmicos, los cuales van a generar un sinergismo con temperaturas superiores a los 45°C (McGuigan y col., 1998). Jhonson y col. (1997) investigaron el efecto de la inactivación de *C. parvum* por la luz solar en agua de mar obteniendo un porcentaje de reducción del 90,0% en la viabilidad de los ooquistes tras un periodo de tres días de exposición. El efecto de la radiación solar sobre la pérdida de viabilidad de los ooquistes de *C. parvum* también se ha confirmado en agua dulce (King y col., 2008). Una aplicación práctica es la desinfección solar del agua (SODIS), método ampliamente utilizado para el tratamiento del agua de bebida en países en vías de desarrollo. Se trata de un proceso sencillo de tratamiento que permite mejorar la calidad del agua de consumo por la inactivación de los agentes patógenos. La desinfección solar del agua se basa en dos componentes de la luz solar: la radiación UV-A con efecto germicida y la radiación infrarroja que provoca una elevación de la temperatura generando un efecto de pasteurización cuando se alcanzan los 45°C-50°C. La combinación de ambos efectos produce una sinergia que incrementa la eficacia del proceso. Este método es muy económico ya que emplea elementos disponibles a nivel local como son botellas transparentes de plástico de tereftalato de polietileno y la luz solar (Fundación SODIS, 2012). En diversos estudios experimentales, se ha



comprobado que aplicando una radiación de  $870 \text{ W/m}^2$  y con una temperatura superior a  $40^\circ\text{C}$ , los (oo)quistes de *C. parvum* y *G. muris* pierden la infectividad tras una exposición de 12 horas y 4 horas, respectivamente (Méndez-Hermida, 2005a; McGuigan y col., 2006).

Posteriormente, Gómez-Couso y col. (2009) observaron un descenso de la viabilidad de los ooquistes de *C. parvum* a medida que aumentaba la temperatura y el tiempo de exposición. Incluso, la aplicación del método SODIS a aguas turbias contaminadas experimentalmente con ooquistes de *C. parvum* disminuyó significativamente la supervivencia de este enteropatógeno (Fontán Sainz, 2012).

La radiación utilizada en los estudios experimentales fue más baja que la que se podría esperar en latitudes tropicales ( $1000 \text{ W/m}^2$ ) (Joyce y col., 1996). Por lo que es razonable esperar que esta inactivación se pudiera conseguir en condiciones naturales en estas latitudes. De hecho, un estudio realizado en Zimbabue (África) mostró niveles de inactivación del 99,9% para *G. duodenalis*, tras la exposición a la radiación solar durante siete horas en botellas de plástico de tereftalato de polietileno pintadas de color negro, lo que favorecía el aumento de la temperatura del agua, llegando esta a  $50^\circ\text{C}$  (Mtapuri-Zinyowera y col., 2009).

Por otra parte, se ha comprobado que varios organismos eucariotas presentes en medios hídricos, entre los que se incluyen varias especies de rotíferos, cladóceros, copépodos amebas, así como el nematodo *Caenorhabditis elegans* son capaces de ingerir (oo)quistes de *C. parvum* y *G. duodenalis* pudiendo influir tanto en su supervivencia como en la diseminación de ambos protozoos en el ambiente (Fayer y col., 2000c; Trout y col., 2002; Ares-Mazás y col., 2004; Huamanchay y col., 2004; Méndez-Hermida y col., 2005b; Connelly y col., 2007).

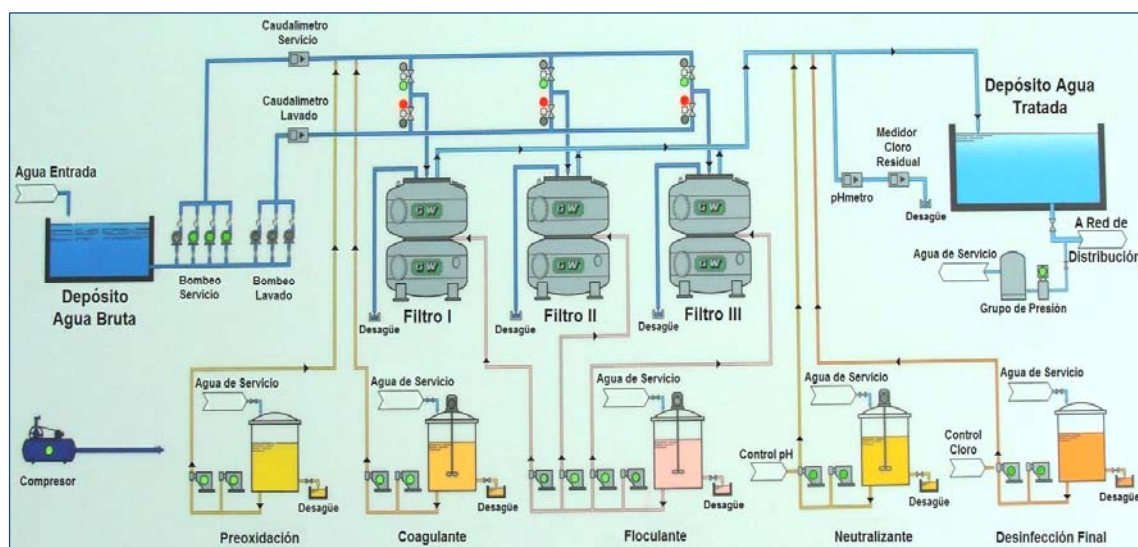
### 2.3.1. Sistemas de tratamiento de agua potable

La garantía de la inocuidad microbiana del abastecimiento de agua de bebida se basa en la aplicación, desde la cuenca de captación hasta el consumidor, de barreras múltiples para evitar la contaminación del agua o para reducirla a niveles que no sean perjudiciales para la salud (Figura 5). La seguridad del agua se mejora mediante la protección de los recursos hídricos, la selección y aplicación correctas de una serie de operaciones de tratamiento y la gestión de los sistemas de distribución para mantener y proteger la calidad del agua tratada. Una estrategia adecuada consistirá en un sistema de gestión basado en la prevención o reducción de la entrada de microorganismos infecciosos a los recursos hídricos y que reduzca la dependencia de los tratamientos para la eliminación de patógenos. En términos generales, los mayores riesgos microbianos son los derivados del consumo de agua contaminada con heces de origen humano o animal que pueden ser fuente de numerosas bacterias, virus, protozoos y helmintos, siendo los patógenos fecales los que más preocupan en la protección



de la salud. Cabe señalar también que pueden producirse aumentos repentinos de la concentración de patógenos incrementando considerablemente el riesgo de enfermedades que podrían desencadenar brotes hídricos. Además, pueden exponerse a la enfermedad numerosas personas antes de que se detecte la contaminación de origen infeccioso. Por estos motivos, para garantizar la inocuidad microbiana del agua de consumo no puede confiarse únicamente en la realización de análisis del producto final, aunque éstos se realicen con frecuencia (OMS, 2011a).

**Figura 5.** Esquema general de un sistema de tratamiento de agua potable.



Los tratamientos más ampliamente utilizados a nivel mundial para potabilizar el agua han sido descritos por la *American Water Works Association* (Estados Unidos), clasificándolos en tres grupos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Clasificación y descripción de los tratamientos del agua de bebida (AWWA, 2007).

Tipo	Composición del Tratamiento	Descripción
A1	Físico simple y desinfección	Filtración y desinfección
A2	Físico, químico y desinfección	Preoxidación, coagulación, floculación, decantación, filtración y desinfección
A3	Físico y químico intensos, afino y desinfección	Preoxidación, coagulación, floculación, decantación, filtración, afino con carbón activo u ozono y desinfección

Sin embargo, las normas sobre el agua de consumo pueden diferir, en naturaleza y forma, de unos países o regiones a otros. No existe un método único que pueda aplicarse de forma universal. En la elaboración y la aplicación de normas, es fundamental tener en cuenta las leyes vigentes y en proyecto relativas al agua, a la salud y al gobierno local, así como evaluar la capacidad para desarrollar y aplicar reglamentos de cada país. Los métodos que pueden funcionar en un país o región no necesariamente podrán transferirse a otros países o regiones. Para desarrollar un marco reglamentario, es fundamental que cada país examine sus necesidades y capacidades. Así, la legislación vigente española (BOE, núm. 45, de 21 de febrero de 2003) recoge en el Real Decreto 140/2003 los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano y considera agua apta para tal fin, aquella que no contenga ningún tipo de microorganismo, parásito o sustancia en una cantidad o concentración que pueda suponer un peligro para la salud humana y cumpla con los requisitos especificados en las partes A (parámetros microbiológicos), B (parámetros químicos) y D (radiactividad) del anexo I.

Por otra parte, una estación de tratamiento de agua potable convencional utiliza diversos procesos unitarios dependientes de las características del agua a tratar, de tal forma que en la mayoría de los países, los sistemas de tratamiento aplicados dan lugar a un agua tipo A2 (ver Figura 5, Tabla 3). La captación puede llevarse a cabo tanto en aguas superficiales como subterráneas instalando, en la zona de bombeo, un sistema de desbaste de residuos y vegetación. La eliminación de los sólidos es fundamental ya que pueden dificultar los procesos de tratamiento, incrementar las necesidades de los productos químicos o impedir el flujo hidráulico en canales y tuberías (Pankratz, 1998). En Galicia, la mayoría de las captaciones de agua para consumo están localizadas en los ríos (Fotografía 1).

Inicialmente, el agua bruta recibe un proceso de preoxidación con el fin de eliminar las sustancias disueltas de origen mineral, los olores y sabores provocados por la presencia de compuestos orgánicos así como algunos microorganismos responsables de enfermedades de transmisión hídrica. Existen diversas sustancias que pueden ser utilizadas como agentes oxidantes para el tratamiento del agua (BOE, núm. 172, de 17 de julio de 2009), siendo el  $O_2$ , el  $Cl_2$  y el  $O_3$  los productos habitualmente empleados. Posteriormente, se aplican procesos de aireación para facilitar el intercambio de gases y sustancias volátiles causantes de olores y sabores. Aunque existen diversos métodos de aireación, generalmente, suelen realizarse por gravedad o por aspersión. Seguidamente, se procede a la eliminación de impurezas por un mecanismo de sedimentación; sin embargo, algunas de estas partículas son demasiado pequeñas, por lo que es necesario aplicar también procesos de clarificación que incluyen métodos de coagulación y floculación. Ambos procesos van a depender de varios factores como son el tipo y la cantidad de coagulante/floculante utilizado, el tiempo de retención, la

agitación y algunas características del agua tales como la turbidez, el pH y la temperatura. El proceso de coagulación implica la adición de diversos productos químicos; por ejemplo, compuestos de aluminio  $-\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  u  $\text{Al}_2\text{O}_3-$  y de hierro  $-\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  o  $\text{FeCl}_3-$  (Masters, 1991; Viessman y Hammer, 1998; BOE, núm. 172, de 17 de julio de 2009).

**Fotografía 1.** Zona de captación de aguas de consumo (A) y detalle de una ETAP (B).



A continuación, se adicionan agentes floculantes en agitación seguido de un proceso de decantación. La velocidad de aglomeración o de floculación depende del número de partículas presentes, del volumen relativo que ocupan y del gradiente de velocidad creado. Sin embargo, algunas de las sustancias empleadas como floculantes tienen también propiedades coagulantes, por lo que en algunos sistemas de tratamiento se opta por la adición de sustancias como  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ , o polisacáridos; por ejemplo,  $(\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6)_n$  y  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$  (BOE, núm. 172, de 17 de julio de 2009). Aunque existe la posibilidad de operar de manera manual, estos procesos habitualmente están automatizados, permitiendo una dosificación óptima de los productos.

Los procesos de sedimentación o decantación se realizan en varias etapas del ciclo del tratamiento del agua. No obstante, en una ETAP convencional, dicho proceso tiene lugar entre la coagulación/floculación y la filtración (De Zuane, 1997). Cabe señalar que entre los diferentes tipos de decantación existentes, los más frecuentes son los estáticos, por contacto de fangos y de lecho de fangos. Sin embargo, las plantas potabilizadoras de pequeños núcleos poblacionales, generalmente, no disponen de decantadores, por lo que el proceso de filtración eliminará los flóculos formados. La filtración trata de eliminar aquellas partículas que no han sedimentado, entorno al 5,0% de los sólidos en suspensión, tras los procesos de coagulación, floculación y sedimentación. Los procesos de filtración más utilizados en las ETAPs emplean filtros por gravedad o por presión que suelen estar constituidos por arena, grava, carbón, multicapas o tierra de diatomeas (Spellman y Drinan, 2000). En los filtros de gravedad o

abiertos el proceso físico va a consistir en hacer pasar el agua a través de un lecho filtrante, normalmente de arena y grava de distinta granulometría, mientras que en los filtros de presión el agua se bombea enérgicamente sobre la capa granular situada en el interior de un depósito de acero completamente sellado (Fotografía 2).

A continuación, algunos sistemas de tratamiento de agua potable realizan un proceso de afino que consiste en aplicar un agente oxidante intenso; por ejemplo, el ozono, con el fin de disminuir la materia orgánica y los microorganismos que pudieran existir en esta fase del tratamiento, así como mejorar las características organolépticas del agua.

Por otra parte, la fluoración es un complemento en el proceso de potabilización del agua en algunos países o regiones. El fluoruro sódico, generalmente, se añade por recomendaciones sanitarias con valores que oscilan entre 0,7 ppm-1,2 ppm. En España, la legislación sobre la obligatoriedad de dosificar flúor en el agua de bebida varía entre las Comunidades Autónomas; por ejemplo, está regulado en Cantabria, Extremadura y Murcia mientras que en Galicia, el Decreto 350/1990 (DOG, núm. 129, de 3 de julio de 1990) sobre fluoración de las aguas de consumo ha sido derogado recientemente, en el mes de junio de 2012, considerando las concentraciones óptimas de flúor en estas aguas y la buena salud bucodental de los escolares.

Finalmente, se realiza un proceso de desinfección con el fin de proporcionar una mayor calidad microbiológica del agua mediante la destrucción o inactivación de los patógenos que pudiesen estar presentes en esta fase del tratamiento. Aunque este proceso reduce el riesgo de que los consumidores adquieran numerosas enfermedades infecciosas, los desinfectantes habitualmente empleados en las ETAPs no garantizan totalmente la seguridad del suministro; por ejemplo, el cloro tiene una eficacia limitada frente a los protozoos patógenos *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. así como a determinados virus. Además, este proceso es ineficaz frente a los patógenos que puedan estar protegidos, de la acción del desinfectante, por flóculos u otras partículas resuspendidas en el agua. En este sentido, cabe señalar que una turbidez elevada puede proteger a los microorganismos de los efectos de la desinfección, estimular la proliferación de bacterias y generar una demanda significativa de agentes desinfectantes (OMS, 2011a). De hecho, la eficacia de un proceso de desinfección depende de varios factores: i) naturaleza y concentración del desinfectante; ii) tiempo de contacto; iii) temperatura y pH; iv) contenido en materia orgánica del agua; y v) tipo y concentración de microorganismos presentes.

Aunque los procesos de desinfección se pueden realizar mediante la aplicación de métodos físicos –radiación ultravioleta–, generalmente, se llevan a cabo a través de productos químicos –cloro y ozono–. El cloro y sus compuestos son oxidantes químicos ampliamente

utilizados por su alto poder bactericida y bajo coste (Bouwer e Idelovith, 1987). Sin embargo, la cloración puede repercutir negativamente tanto en la salud como en la agricultura y en la acuicultura (Reed y col., 1976). Esto es debido a que el cloro, generalmente, se adiciona en forma de gas (Fotografía 3) o bien formulado como hipoclorito sódico o hipoclorito cálcico, reaccionando con diversas sustancias orgánicas y produciendo compuestos organoclorados, simples o complejos, marcadamente tóxicos (Westcott y Ayers, 1984; Richardson y col., 2007). El valor máximo de cloro residual libre permitido en el agua de bebida es de 1,0 mg/l. Esta cantidad puede ser idónea para eliminar bacterias patógenas (0,2 mg/l de cloro residual con 10 minutos de tiempo de exposición; pH= 7); sin embargo, es insuficiente tanto para inactivar a los enterovirus (Kelly y Sanderson, 1960) como las formas infectantes de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. (Korich y col., 1990; Carmena y col., 2007; Cummins y col., 2010).

**Fotografía 2.** Filtros de gravedad o abiertos (A) y de presión o cerrados (B).



El ozono es otro agente oxidante muy utilizado para la desinfección del agua de bebida. Los mecanismos de desinfección asociados con su uso incluyen: i) la oxidación o destrucción directa de la pared de la célula del microorganismo o parásito; ii) el daño a los componentes de los ácidos nucleicos (purinas y pirimidinas); y iii) la ruptura de las uniones de carbono-nitrógeno que conducen a la despolimerización. La eficacia de la desinfección depende de la susceptibilidad de los organismos a ser tratados, del tiempo de contacto y de la concentración de ozono (Corona-Vasquez y col., 2002; Haas y Kaymak, 2003). Sus propiedades bactericidas son superiores a las del cloro. Concretamente, la enterobacteria *Escherichia coli* se destruye en menos de 100 segundos en presencia de una concentración de ozono libre de 0,01 mg/l. Sin embargo, estudios experimentales realizados en un modelo murino lactante, han confirmado la infectividad de ooquistes de *C. parvum* previamente sometidos a la acción de 0,4 mg/l de ozono libre durante 120 segundos (Ares-Mazás y col., 1989; Peeters y col., 1989).



Estudios llevados a cabo por Korich y col. (1990) han comprobado que los quistes de *Giardia* spp. son menos resistentes que los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. a los procesos de ozonización. Cabe destacar que el ozono va reduciendo su efectividad a medida que disminuye la temperatura, por lo que en algunas ocasiones se requieren tiempos de exposición más altos que deben ser controlados para evitar la formación de productos tóxicos –bromatos– y cuyos niveles están limitados por las legislaciones de cada país; concretamente, en España se recogen en el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano (BOE, núm. 45, de 21 de febrero de 2003). Sin embargo, el ozono presenta ciertas desventajas como su inestabilidad, baja solubilidad o elevado coste. Además, los equipos que utilizan el ozono tienen que estar diseñados con materiales resistentes, al igual que los equipos de seguridad de los empleados que manipulan el producto.

La radiación ultravioleta (UV) es un método físico de desinfección utilizado principalmente en grandes caudales de agua y se considera una buena alternativa al uso del cloro y del ozono en el tratamiento tanto de aguas para consumo como de aguas residuales. Los microorganismos son inactivados por la luz UV como resultado del daño fotoquímico a sus ácidos nucleicos. De hecho, se forman dímeros del tipo tiamina-tiamina, citosina-citosina o citosina-tiamina, entre otros. La formación de un número suficiente de dímeros dentro de un microorganismo impide que éste replique su ADN y ARN, lo que impide su reproducción. Estos sistemas funcionan mediante emisores de vapor de mercurio de manera que una longitud de onda de 260 nm proporcionará una importante efectividad germicida. Sin embargo, existen varios parámetros que afectan a la eficacia de este proceso de desinfección; por ejemplo, la transmitancia del fluido, el diseño de la cámara de desinfección o el tiempo de contacto.

Se ha comprobado, a nivel experimental, que la bacteria *E. coli* se inactiva a 6 mJ/cm<sup>2</sup>. Sin embargo, en condiciones naturales pueden existir sólidos en suspensión que afectan a la transmitancia y en consecuencia al valor teórico, reduciendo la eficacia del tratamiento (Wilson y col., 1992; Hijnen y col., 2006). Este método de desinfección altera la infectividad de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp., no obstante, son necesarios largos períodos de exposición para obtener una desinfección total, por lo que su eficacia podría ser muy baja en condiciones naturales (Craig y col., 2000; Campbell y Wallis, 2002; Clancy y col., 2002; Morita y col., 2002; Rochelle y col., 2004). De hecho, en condiciones experimentales se comprobó que solo tiempos de exposición superiores a 150 minutos son altamente eficaces (Lorenzo-Lorenzo y col., 1993b; Clancy y Hargy, 2007). En la Tabla 4, se muestran las tasas de inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *Giardia* spp. en relación con la intensidad de radiación UV aplicada (USEPA, 2006).

**Fotografía 3.** Detalle de las instalaciones de cloro gas en una ETAP.

En todos los procesos de tratamiento de agua de bebida, un parámetro a controlar es el pH cuyos valores deben oscilar entre 6,5-9,5. Con el fin de corregir posibles alteraciones en este parámetro, se emplean varios reactivos bien para alcalinizar –NaOH,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ – o bien para acidificar – $\text{H}_2\text{SO}_4$ , HCl– el agua (BOE, núm. 172, de 17 de julio de 2009).

**Tabla 4.** Intensidad de radiación UV necesaria para la inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *Giardia* spp.

Tasa inactivación (log)	<i>Cryptosporidium</i> spp. Intensidad UV ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )	<i>Giardia</i> spp. Intensidad UV ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )
0,5	1,6	1,5
1,0	2,5	2,1
1,5	3,9	3,0
2,0	5,8	5,2
2,5	8,5	7,7
3,0	12	11
3,5	15	15
4,0	22	22

Una vez finalizado el proceso de potabilización, se almacena y se distribuye el agua a la población. El almacenamiento se realiza en depósitos impermeables, generalmente contruidos de hormigón, cuyo diseño y características evitan la contaminación y aseguran una provisión de agua para, al menos, 24 horas.

### 2.3.2. Sistemas de depuración de agua residual

La correcta eliminación de excretas es una de las primeras medidas insistentemente recomendadas por diferentes organizaciones internacionales como la OMS; la Agencia de Protección Ambiental (USEPA) y el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos, entre otras. La evacuación inadecuada e insalubre de heces humanas y animales infectadas lleva a la contaminación del suelo, de las fuentes de aprovisionamiento de agua y de los alimentos. Sin duda, agua y alimentos contaminados son los vehículos principales de transmisión, de numerosas bacterias, virus, hongos y un gran número de parásitos, ocasionando graves enfermedades infecciosas y creando un ambiente realmente intolerable para el desarrollo de un nivel de bienestar de acorde con las actuales demandas sociales. El problema presenta cada día mayor importancia al haberse incorporado a las tradicionales aguas residuales urbanas, cantidades progresivamente crecientes de aguas residuales industriales, especialmente las que contienen desechos de origen animal, lo que conlleva mayores dificultades para su depuración.

Sin embargo, la depuración de aguas residuales no es un problema fácil de resolver y enjuiciar, en razón del gran volumen que hay que tratar y de la peligrosidad de estas aguas. No existe, hasta la fecha, un criterio unánime de parámetros microbiológicos y parasitológicos que han de cumplir las aguas residuales tratadas. De hecho, las legislaciones son diversas, muy flexibles y en algunos casos absolutamente insuficientes. De ahí que varias naciones, entre las que se incluyen algunos países de la Unión Europea y los Estados Unidos, disponen de recursos financieros para prevenir brotes infecciosos causados por transmisión hídrica. La cooperación entre las industrias dedicadas al control del agua y el gobierno está considerada como una de las razones por las cuales descendió la frecuencia de las enfermedades hídricas en Estados Unidos, donde siguen las normas de la USEPA. En España, la depuración de las aguas residuales está regulada por el Real Decreto 11/1995 (BOE, núm. 312, de 30 de diciembre de 1995) y el Real Decreto 509/1996 (BOE, núm. 77, de 29 de marzo de 1996) en los que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas.

Además, la reutilización de las aguas residuales procedentes de EDARs se ha intensificado en muchos países, sobre todo para usos agrícolas, por lo que necesita cada vez más garantías de control debido al peligro que pueden tener tanto para la sanidad animal como humana (Bukhari y col., 1997; Robertson y col., 2000, 2006b; Quintero-Betancourt y col., 2003; Di Giovanni y col., 2006; Lalancette y col., 2012). Concretamente, en España cada vez es más frecuente reutilizar las aguas residuales depuradas en el sector agroalimentario o como fuente de riego en áreas recreativas de ahí la necesidad de establecer un régimen jurídico para la reutilización de las aguas depuradas (BOE, núm. 294, de 8 de diciembre de 2007).



El diagrama ilustra el flujo de agua y fangos en una planta de tratamiento. Los componentes principales incluyen:

- Entrada Agua Bruta:** Punto de entrada inicial.
- Reja de Gruesos:** Filtra los sólidos grandes.
- Bombeo Agua Bruta:** Mueve el agua desde la reja.
- Sobrenadantes Decantador / Sobrenadantes Espesador:** Tanques para la decantación inicial.
- Clasificador de Arena:** Elimina la arena del agua.
- Decantador Secundario:** Tanque principal para la decantación de lodos.
- Reactor Biológico:** Tanque donde ocurre el tratamiento biológico.
- Espesador de Fangos:** Concentra los fangos.
- Deshidratador de Fangos:** Reduce el contenido de agua de los fangos.
- Centrífuga:** Separa los fangos del agua.
- Concentrador de grasas:** Elimina las grasas del agua.
- Red General de Vaciado:** Sistema de tuberías para el vaciado de los tanques.
- Bombeo Recirculación Fangos / Bombeo Exceso Fangos:** Mueven los fangos de vuelta al proceso.
- Cabecera EDAR / Red General de Vaciado:** Puntos de conexión para el agua de la planta.
- Red Agua Potable:** Fuente de agua para el proceso.
- Bombeo Fangos:** Mueve los fangos desde el reactor biológico.
- Equipo preparación polielectrolito:** Prepara los coagulantes para la floculación.
- Compressor:** Proporciona aire para el reactor biológico.
- Aire de Servicios:** Fuente de aire para la planta.

Sin embargo, las aguas residuales se generan por la adición de aguas negras o domésticas; aguas grises o industriales; aguas blancas o pluviales y aguas procedentes de explotaciones ganaderas, representando para la colectividad un peligro sanitario y ocasionando un gran problema para su eliminación. Al mezclarse unas aguas con otras las concentraciones de los elementos contaminantes variarán. Por tanto, para poder realizar una estimación de la contaminación del agua residual resultante es necesario utilizar el concepto de carga contaminante. De acuerdo con la Directiva Europea 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, la carga contaminante de un núcleo, industria, aglomeración o territorio se define como el número de habitantes equivalentes que genera ese núcleo, industria, aglomeración o territorio, considerando por

habitante equivalente la carga orgánica biodegradable con una  $\text{DBO}_5$  de 60 g de oxígeno/día. La carga contaminante generada por un núcleo poblacional se obtendrá por la suma de:

- Carga contaminante de las aguas residuales domésticas generadas por el núcleo de población. En este caso, se considera la población residente en dicho núcleo, ya que una persona genera una contaminación de un habitante equivalente.
- Carga contaminante de las aguas industriales del núcleo poblacional. En este caso, se obtendrá por la suma de los habitantes equivalentes de las industrias asentadas en el núcleo y que vierten a la red de colectores de la citada entidad poblacional. Los habitantes equivalentes de cada industria se determinarán en función del proceso industrial y del tamaño de la industria.

A nivel global de Galicia existe también la carga contaminante de una serie de industrias, que bien por su situación, por sus características o bien por sus propios sistemas de saneamiento, no están conectadas a las redes urbanas de colectores. Esta carga contaminante y según datos extraídos de la Consellería de Medio Ambiente, Territorio e Infraestructuras de la Xunta de Galicia, se estima en 1.363.316 habitantes equivalentes. Asimismo, existe la carga contaminante que se crea en las explotaciones ganaderas con características que dependen del tipo de explotación y con tratamiento que es diferente al aplicado en el agua residual de tipo urbano. De acuerdo con la información recogida del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente en el año 2010, el censo ganadero de Galicia era de 949.766 cabezas de ganado bovino; 282.206 de ganado ovino/caprino y 1.018.941 de ganado porcino; dato importante teniendo en cuenta los resultados epidemiológicos obtenidos sobre la prevalencia de la cryptosporidiosis y la giardiosis en estas ganaderías (Ares-Mazás y col., 1988; Castro-Hermida y col., 2002a, 2006a, 2007a,b). Si bien es posible emplear aquí el concepto de habitante equivalente, no parece adecuado al convertirse en una contaminación mucho más difusa e indirecta.

La depuración natural (filtro verde o lechos de arena) de las aguas residuales está limitada por la necesidad de grandes superficies de terreno, aproximadamente  $40 \text{ m}^2/\text{habitante}$  equivalente y solo puede ser empleada para los vertidos totalmente biodegradables. No obstante, parecen ser altamente eficientes en la eliminación de (oo)quistes de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. (Reinoso y col., 2008; Graczyk y col., 2009; Redder y col., 2010). En consecuencia, los sistemas artificiales o convencionales de depuración de aguas residuales son los más ampliamente utilizados. Nos centraremos, por tanto, en los sistemas de depuración artificial más extendidos en nuestro país. Como se ha mostrado en la Figura 6, estos sistemas incorporan procesos físico-químicos y biológicos, llevados a cabo en estaciones depuradoras de aguas residuales y aplicados en varias etapas (pretratamiento y tratamientos primario, secundario y terciario).

Durante las etapas del pretratamiento y tratamiento primario, el afluente se somete a un desbaste inicial o cribado con el fin de retener los sólidos en suspensión más gruesos; posteriormente, se disminuye la velocidad del agua para producir la sedimentación de gravas y arenas (desarenado). En la fase final del pretratamiento se realiza un proceso de desengrasado que consiste en la inyección de burbujas de aire junto con agentes espumantes que permiten eliminar hasta un 80,0% de grasas y aceites (Fotografía 4). A continuación, se realiza el tratamiento primario que tiene como objetivo la separación, por medios físicos o físico-químicos, de sólidos en suspensión que no fueron retenidos durante el proceso de pretratamiento. Esta separación se realiza mediante decantación primaria. En este proceso las partículas de un tamaño superior a 20  $\mu\text{m}$  sedimentan si se aplican tiempos de retención superiores a tres horas.

**Fotografía 4.** Detalle de los canales de desarenado y desengrasado.



Las reducciones alcanzadas por los principales parámetros indicadores se sitúan entre el 25,0%-40,0% para la demanda bioquímica de oxígeno ( $\text{DBO}_5$ ) y el 40,0%-60,0% para los sólidos en suspensión. Los efectos que tiene el tratamiento primario sobre los organismos patógenos suele ser muy variable. Este proceso de sedimentación puede eliminar huevos de helmintos, junto a los que se depositan algunas bacterias, virus y protozoos. Sin embargo, diversos autores han observado que durante los procesos de pretratamiento y tratamiento primario la eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *Giardia* spp. es muy baja (Chauret y col., 1999; Payment y col., 2001; Ghosh y col., 2009, Fu y col., 2010). Recientemente, se comprobó que la eficacia de estos procesos sobre la eliminación de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp., se encontraba entorno al 0,13 log y 0,18 log respectivamente (Zhang y col., 2008; Fu y col., 2010).

El tratamiento secundario se caracteriza por incluir un proceso biológico seguido de una decantación secundaria. Con este proceso se logra eliminar la mayor parte de la materia

orgánica biodegradable no retirada durante el tratamiento primario. Para ello, se provoca el desarrollo de microorganismos capaces de asimilar y oxidar la materia orgánica en presencia de oxígeno y nutrientes, por lo que también se denominan tratamientos biológicos. Sin embargo, el funcionamiento de un proceso biológico depende de diversos factores del agua residual:

- ▶ Tipo y concentración de la materia orgánica y de los microorganismos presentes.
- ▶ Temperatura y pH.
- ▶ Concentración de oxígeno, nitrógeno y fósforo.

Para este tipo de tratamientos existe una gran diversidad de sistemas de depuración. El sistema de lodos o fangos activados consiste en desarrollar en tanques, aireados y agitados por diversos mecanismos, un cultivo bacteriano alimentado con agua residual (reactor biológico). Este cultivo forma unos bioflóculos o lodos activados que, tras un tiempo de contacto, se envían junto al agua residual (licor de mezcla) a un clarificador (decantador secundario), donde el agua depurada es separada de los fangos (Fotografía 5). Un porcentaje de estos últimos se recircula al tanque de aireación para mantener en el mismo una concentración suficiente de biomasa activa. Este sistema denominado de mezcla completa o de flujo es el más utilizado en grandes instalaciones. Sin embargo, existe una variante de reactor biológico por lodos activados, en la cual, la recirculación de los fangos se sustituye por un sistema de aireación prolongada. Este sistema se utiliza en pequeñas instalaciones.

El tratamiento de lodos o fangos activados puede dar lugar a reducciones importantes de la DBO<sub>5</sub> (85,0%-95,0%) y de los sólidos en suspensión (70,0%-95,0%). Este tratamiento elimina al menos el 90,0% de los virus y entre el 80,0%-95,0% de las bacterias; sin embargo, no suele destruir los huevos de helmintos aunque contribuye a su parcial eliminación en los procesos de digestión de lodos. Villacorta-Martínez de Maturana y col. (1992) realizaron una simulación en el laboratorio sobre la retención de ooquistes de *C. parvum* en aguas residuales mediante el tratamiento con fangos activados, observando un porcentaje de reducción del 84,0%. No obstante, el 16,0% de los ooquistes recuperados fueron suficientes para desarrollar la infección cuando se inocularon a ratones neonatales Swiss CD-1.

Posteriormente, se realizaron estudios en EDARs confirmando que el tratamiento de fangos activados disminuye significativamente la eliminación de ambos patógenos, aunque permanece un porcentaje de formas parasitarias potencialmente infectantes para el hombre y los animales (Cacciò y col., 2003; Montemayor y col., 2005; Graczyk y col., 2007; Lim y col., 2007; Cheng y col., 2009).

**Fotografía 5.** Detalle de un reactor biológico y de un decantador secundario.



Los filtros percoladores o lechos bacterianos, es otro sistema de tratamiento secundario que consiste en depósitos rellenos de un medio filtrante de gran superficie (piedras, gravas, materiales sintéticos), que se recubren por una película de microorganismos aerobios, sobre los que se distribuye el agua residual, previamente decantada, por aspersión. Los rendimientos en la reducción de sólidos en suspensión,  $\text{DBO}_5$  y microorganismos patógenos, incluidos *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp., son similares a los obtenidos en los sistemas de tratamiento de fangos activados (Wiandt y col., 2000; Bowman, 2008).

Las lagunas aerobias, también denominadas de oxidación o de maduración, mantienen un ambiente aerobio en toda la masa de agua mediante el empleo de grandes superficies de encharcamiento en relación con las cargas orgánicas aplicadas, de tal forma que la fotosíntesis y la difusión sean suficientes para proporcionar el oxígeno consumido por las bacterias para transformar la materia orgánica.

Con estos dispositivos se consigue una elevada reducción de microorganismos del agua tratada, así como una importante tasa de mineralización de la materia orgánica aplicada. Para disminuir la superficie de tratamiento o aumentar la velocidad de depuración, se pueden utilizar lagunas más reducidas con aporte forzado de oxígeno (lagunas aireadas). Los intervalos de reducción de los diferentes parámetros varían entre un 60,0%-96,0% para la  $\text{DBO}_5$  y los sólidos en suspensión; la reducción de coliformes puede llegar a alcanzar el 100%. Sin embargo, Lim y col. (2007) comprobaron en un estudio realizado en EDARs que este sistema de tratamiento reduce significativamente la concentración de quistes de *Giardia* spp. (92,0%) pero no la concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (33,0%).



Otro tipo de tratamiento secundario utilizado son los contactores biológicos rotativos o biodiscos. Este sistema consiste en un cilindro plástico o de acero inoxidable de gran tamaño y superficie, que gira alrededor de un eje horizontal, especialmente reticulado para permitir un rápido asentamiento y fijación de colonias bacterianas encargadas de asimilar y mineralizar la materia orgánica. El biodisco gira lentamente pasando por una fase de contacto por inmersión en el agua residual (fase de asimilación de materia orgánica) y otra de aireación (fase de respiración). Este sistema de tratamiento de bajo coste está especialmente indicado para pequeñas entidades poblacionales y núcleos de montaña, en los que las condiciones de bajas temperaturas o alta pluviometría no son las adecuadas para el correcto funcionamiento de otros sistemas de tratamiento secundario. Además, los rendimientos de depuración de las EDARs con tratamientos mediante biodiscos son equiparables a los mostrados por las estaciones depuradoras de fangos activados (Fotografía 6A). Las reducciones medias obtenidas son del orden del 70,0%-90,0% para la DBO<sub>5</sub>, 75,0%-97,0% para los sólidos en suspensión y del 85,0% para los coliformes. Sin embargo, este proceso no es eficaz para la reducción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *Giardia* spp. (Bowman, 2008).

Tras el tratamiento secundario, el efluente no está suficientemente depurado, por lo que resulta necesario aplicar un tratamiento terciario adicional que implica la mejora de la calidad del efluente para reducir el impacto sobre el ambiente en el que se libera. La mejora de la calidad de los efluentes puede realizarse a través de diversos procesos, muy diferentes en cuanto a su naturaleza y aplicación, que se denominan tratamientos terciarios. Aunque en Galicia la mayoría de las depuradoras no aplican un tratamiento terciario, en aquellas EDARs que tratan el efluente secundario, la desinfección es el tratamiento más comúnmente aplicado en las estaciones depuradoras. A igual que ocurría en las ETAPs, su finalidad es proporcionar al efluente una mayor calidad microbiológica a través de la destrucción o inactivación de los microorganismos patógenos presentes, siendo los tratamientos usualmente empleados los mismos que en plantas potabilizadoras: cloración, ozonización y radiación UV. En el caso de las EDARs, aunque los procesos de desinfección se pueden llevar a cabo a través de productos químicos –cloro y ozono– por lo general, se realizan mediante la aplicación de métodos físicos –radiación ultravioleta–.

El cloro y sus compuestos son oxidantes químicos muy utilizados por su alto poder bactericida en relación a su bajo coste (Bouwer e Idelovith, 1987). No obstante, diversos autores han puesto de manifiesto que tanto los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *Giardia* spp. como los huevos de helmintos no son inactivados a las concentraciones de cloro utilizadas en las EDARs (5-20 mg/l), sino que son necesarias concentraciones de cloro más elevadas (Jarroll y col., 1981; Feachem y col., 1983; Leahy y col., 1987; Korich y col., 1990).

El ozono es otro producto químico utilizado para la desinfección de aguas residuales. La desinfección con ozono tiene la ventaja de ser efectiva contra patógenos resistentes al cloro, como virus y huevos de helmintos (Xu y col., 2002; Campos-Reales-Pineda y col., 2008). Se ha comprobado que la ozonización reduce significativamente la viabilidad y la infectividad de los (oo)quistes de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp., en comparación con la cloración (Quintero-Betancourt y col., 2003; Pereira y col., 2008). Sin embargo, para que el tratamiento con ozono sea eficaz es necesario aplicar elevadas concentraciones en el agua residual con tiempos de exposición altos. Para la eliminación de ambos protozoos, se requieren concentraciones de ozono significativamente superiores a las necesarias para la inactivación de bacterias, virus y huevos de helmintos (Xu y col., 2002; Campos-Reales-Pineda y col., 2008).

La radiación UV, como hemos comentado, es un método físico ampliamente utilizado en aquellas EDARs que tratan el efluente secundario (Fotografía 6B). Diversos estudios han demostrado la inactivación de ooquistes de *C. parvum* y de quistes de *Giardia* spp. tras la exposición a la luz UV (Campbell y Wallis, 2002; Clancy y col., 2002; Morita y col., 2002; Rochelle y col., 2004; Li y col., 2009).

**Fotografía 6.** Detalle de un contactor biológico rotativo o biodisco (A) y de lámparas de luz UV (B).







## **PRESENTACIÓN DE LAS PUBLICACIONES**



El Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado (BOE, núm. 35, de 10 de febrero de 2011) establece que las universidades deben implantar procedimientos de control con el fin de garantizar la calidad y validez de las Tesis Doctorales. Según la normativa actual de la Universidad de Santiago de Compostela, los doctorandos pueden optar por la presentación de la Tesis Doctoral en la modalidad tradicional o por compendio de publicaciones. La memoria de Tesis Doctoral presentada bajo esta última modalidad habrá de contener, al menos, una introducción o revisión bibliográfica y una discusión que dote de coherencia y unidad los diferentes trabajos publicados así como unas conclusiones y bibliografía comunes. Además, un requisito indispensable es que sólo se pueden incluir artículos que estén publicados.

De acuerdo con la reglamentación de la Universidad de Santiago de Compostela, el trabajo que se presenta se acoge a la modalidad de Tesis Doctoral por compendio de publicaciones y consta de seis artículos, publicados en revistas científicas cuyos índices de impacto están incluidos en el *Journal of Citation Reports®*, sobre una misma línea de investigación. El nexo común que los une es el de profundizar en la epidemiología de dos enfermedades parasitarias, cryptosporidiosis y giardiosis, en animales domésticos y silvestres (juveniles y adultos), estimar el grado de contaminación de las aguas superficiales por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en zonas eminentemente ganaderas y de caza. Además, no sólo se han determinado las especies y los genotipos circulantes en dichas zonas sino también la potencial viabilidad de las formas infectantes, lo que podría permitir controlar las áreas donde se va a captar agua para el consumo humano y animal. Por tanto, las investigaciones planteadas y detalladas en cada uno de los seis artículos que constituyen el cuerpo de esta Tesis Doctoral pretenden aportar una contribución parcial al objetivo general anteriormente citado.

Todos los artículos se han publicado entre los años 2008-2011 y con fecha posterior a la del inicio de los estudios de doctorado. Se han divulgado tres trabajos en la revista *Water Research* cuyo índice de impacto ha ido incrementando desde 3,587 en el año 2008 hasta alcanzar un valor de 4,546 en el año 2010. Esta revista publica investigaciones originales relacionadas con la ciencia y la tecnología de la calidad del agua y su gestión en el mundo, por lo que engloba numerosas áreas de conocimiento. De hecho, la revista *Water Research*, considerada como una de las más prestigiosas en diversos ámbitos científicos, ha estado siempre alojada en el primer cuartil de varias categorías temáticas incluyendo Ingeniería y Medio Ambiente, Ciencias Ambientales y Recursos Hídricos. Otros dos artículos que forman parte de esta Tesis Doctoral han sido publicados en la revista *Science of the Total Environment* cuyo índice de impacto también ha aumentado gradualmente desde 2,579 que tenía en el año

2008 hasta un valor de 3,190 alcanzado en el año 2011. Esta revista, cuyo alcance es de carácter multidisciplinar, durante los cinco últimos años también ha figurado en el primer cuartil de la categoría temática de Ciencias Ambientales. El otro artículo que forma parte de esta memoria de Tesis Doctoral ha sido publicado en la revista *Veterinary Parasitology* que acreditó un índice de impacto de 2,331 en el año 2011, localizándose en el segundo cuartil en el área de Parasitología y en el primer cuartil de la categoría temática de Ciencias Veterinarias.

Con el fin de ordenar la presentación de las publicaciones, los artículos se han clasificado en dos grupos que se corresponden con los siguientes estudios:

1. PREVALENCIA DE LA CRYPTOSPORIDIOSIS Y DE LA GIARDIOSIS EN ANIMALES DOMÉSTICOS Y SILVESTRES: CONTRIBUCIÓN A LA CONTAMINACIÓN DE AGUAS SUPERFICIALES.

En esta sección se incluyen tres artículos en los que se ha establecido con mayor precisión la extensión de la cryptosporidiosis y la giardiosis bovina y ovina en Galicia y se ha valorado el papel de los animales silvestres en la transmisión de estas enfermedades. También se ha investigado el efecto de la actividad ganadera sobre la contaminación de las aguas superficiales por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*. Teniendo en cuenta que existen poblaciones zoonóticas de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*, en estos estudios se han caracterizado molecularmente aislados de ambos parásitos procedentes de los animales domésticos y silvestres así como de las aguas.

2. CONTAMINACIÓN DEL AGUA CON FORMAS INFECTANTES DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. Y *GIARDIA DUODENALIS*. RIESGO EN SANIDAD ANIMAL Y EN SALUD PÚBLICA.

En esta sección se incluyen otros tres artículos en los que se ha determinado el grado de contaminación de las aguas superficiales por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en zonas o sistemas de explotación hidrográfica eminentemente ganaderos, así como en sus respectivas subcuencas y áreas o unidades de conocimiento (estaciones de bombeo, embalses, confluencias hidrográficas, etc...). Además, teniendo en cuenta que en Galicia los efluentes de las estaciones depuradoras de agua residual vierten a las cuencas hidrográficas, se valoró la importancia de las EDARs en el ciclo epidemiológico de la cryptosporidiosis y de la giardiosis. También se han realizado estudios de biología molecular, lo que ha permitido explicar mejor las rutas de transmisión de ambas enfermedades parasitarias en las zonas estudiadas.

A continuación, se presentan los seis artículos que constituyen el cuerpo de la Tesis Doctoral, clasificados de acuerdo con las dos secciones consideradas anteriormente. De esta forma, se construye un hilo argumental que facilita la presentación del trabajo llevado a cabo en la Tesis Doctoral, relacionándolo con las publicaciones compendiadas, de manera que queda justificada nuevamente su unidad temática.

# 1. PREVALENCIA DE LA CRYPTOSPORIDIOSIS Y DE LA GIARDIOSIS EN ANIMALES DOMÉSTICOS Y SILVESTRES: CONTRIBUCIÓN A LA CONTAMINACIÓN DE AGUAS SUPERFICIALES.

## Artículo 1.1.

**Título:** *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain).

**Autores:** Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M.

**Revista:** *Science of the Total Environment*, 409: 2451-2459. 2011.

**Índice de impacto:** 3,190.

**Categoría temática de la revista y posición:** Ciencias Ambientales (26 / 193).

Este artículo describe la dispersión ambiental de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en dos áreas claramente diferenciadas de Galicia: 1) costera, turística, con una alta densidad de población y 2) interior, agrícola, con un elevado censo ganadero. En las dos zonas de estudio se analizaron muestras fecales de animales domésticos y silvestres y muestras de agua (afluente y efluente) de ETAPs y EDARs.

Para la detección de *Cryptosporidium* spp., las muestras de heces se examinaron por microscopía óptica normal (animales < 1 mes) utilizando la tinción negativa de Heine y por microscopía de fluorescencia (animales > 1 mes) empleando anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína. Esta misma técnica fue la empleada para la detección de quistes de *G. duodenalis* en las heces de todos los animales. En cada planta de tratamiento/depuración, se filtraron entre 25 y 100 l del agua de entrada y de salida usando filtros específicos que concentran las formas parasitarias. Los (oo)quistes se clarificaron por separación inmunomagnética (IMS), se identificaron por inmunofluorescencia directa (IFD) y se evaluaron mediante coloración vital (ioduro de propidio). Para la identificación de especies y genotipos en muestras de animales domésticos y aguas, se procedió a la amplificación y secuenciación de los genes 18S SSU ARNr (*Cryptosporidium* spp.) y  $\beta$ -giardina (*Giardia* spp.).

En la zona 1, las prevalencias medias de cryptosporidiosis y giardiosis en todos los animales examinados fueron del 9,2% y 15,9%. En relación a la contaminación hídrica, se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en los afluentes o efluentes de 2/12 ETAPs (16,6%) y 8/12 EDARs (66,6%). También se detectaron quistes de *G. duodenalis* en los afluentes o efluentes de 3/12 ETAPs (25,0%) y 12/12 EDARs (100%). En los animales se identificaron *C. andersoni*, *C. parvum* y *G. duodenalis* genotipos A-I y E. En las aguas residuales se detectaron *C. hominis*, *C. parvum* y *G. duodenalis* genotipos AI, A-II y E.

En la zona 2, los animales tuvieron prevalencias medias de cryptosporidiosis (13,7%) y giardiosis (26,7%) significativamente superiores ( $P<0,05$ ) a las halladas en los animales de la zona 1. También fue superior el porcentaje de ETAPs en las que se detectaron formas infectantes de ambos parásitos, aunque estas diferencias no fueron significativas. Además, en las EDARs de esta zona se detectaron concentraciones medias de ooquistes/quistes significativamente superiores ( $P<0,05$ ) a las halladas en las EDARs de la zona 1. En los animales, se identificaron *C. andersoni*, *C. parvum* y *G. duodenalis* genotipos A-I, B y E. En las aguas residuales se detectaron *C. andersoni*, *C. parvum* y *G. duodenalis* genotipos A-I, A-II y E. En la zona 2, la contaminación de las aguas residuales fue mayor y además se identificó el genotipo E de *G. duodenalis* que es de origen animal (artiodáctilos), lo que probablemente refleja una mayor contribución de los animales domésticos a la contaminación ambiental en esta zona. La mayor concentración de formas parasitarias en el ambiente y el hecho de que la mayoría de las especies y genotipos identificados sean zoonóticos tiene importancia desde el punto de vista de la salud animal y humana.

#### Artículo 1.2.

---

**Título:** Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Galicia (NW, Spain).

**Autores:** Castro-Hermida, J.A.; García-Preseido, I.; González-Warleta, M.; Mezo, M.

**Revista:** *Veterinary Parasitology*, 179: 216-219. 2011.

**Índice de impacto:** 2,331.

**Categoría temática de la revista y posición:** Ciencias Veterinarias (9 / 145) y Parasitología (9 / 32).

---

Este artículo ha sido el primer estudio amplio realizado en España en el que se determinó la prevalencia e intensidad de infección de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en corzos y jabalíes. Estos animales son los principales ungulados silvestres que habitan en el entorno de las explotaciones ganaderas de Galicia y comparten en ocasiones áreas de pastoreo con el ganado, por lo que pueden participar en la transmisión de ambas protozoosis. Con el fin de conocer la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en corzos y jabalíes, se realizó un amplio estudio *ad hoc* en el que se recogieron, directamente del recto, muestras fecales de 224 corzos y 381 jabalíes abatidos durante la temporada de caza 2008-2009. Los (oo)quistes se identificaron mediante una técnica de IFD empleando anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína. En los corzos, la prevalencia de la cryptosporidiosis y de la giardiosis fue de 1,3% y 5,3%, respectivamente. Se comprobó que la prevalencia de la infección por *G. duodenalis* fue significativamente mayor ( $P<0,05$ ) en los

animales más jóvenes. En los jabalíes, la prevalencia de la cryptosporidiosis y de la giardiosis fue de 7,6% y 1,3%, respectivamente. Se observó que la infección por *Cryptosporidium* spp. fue significativamente mayor ( $P<0,05$ ) en los animales más jóvenes. En ambas especies animales, el número de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. por gramo de heces osciló entre 5-200 y el número de quistes de *G. duodenalis* por gramo de heces fluctuó entre 5-47. Estas cifras de excreción reflejan niveles de infección moderados que concuerdan con la ausencia de signos clínicos en los animales examinados.

Al igual que sucede en otras especies animales, las prevalencias de infección fueron mayores en los animales más jóvenes, probablemente debido a su mayor susceptibilidad a la infección. La giardiosis fue más prevalente en corzo, mientras que en jabalí predominó la infección por *Cryptosporidium* spp., lo que podría deberse a diferencias entre ambas especies cinegéticas en los niveles de contaminación de sus hábitats, en las características de su dieta o en su susceptibilidad a estas infecciones. La contribución de corzos y jabalíes a la diseminación de la cryptosporidiosis y de la giardiosis es poco relevante, al menos en las condiciones en que actualmente se mantienen ambas poblaciones cinegéticas en Galicia.

### Artículo 1.3.

**Título:** Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals.

**Autores:** Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M.

**Revista:** *Water Research*, 43: 4133-4142. 2009.

**Índice de impacto:** 4,355.

**Categoría temática de la revista y posición:** Ingeniería y Medio Ambiente (3 / 42), Ciencias Ambientales (9 / 181) y Recursos Hídricos (1 / 66).

En este artículo los autores determinan el efecto de la actividad ganadera sobre la contaminación de las aguas superficiales por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*. Para ello, se realizó un estudio longitudinal en una cuenca hidrográfica con elevado censo ganadero. Se hizo un seguimiento anual (primavera, verano, otoño e invierno) en 29 puntos del sistema hidrográfico y en 18 granjas de ganado bovino lechero con influencia sobre el sistema hidrográfico seleccionado. Se analizaron un total de 116 muestras de agua, 139 terneros recién nacidos, 480 novillas y 697 vacas. En las muestras fecales de animales menores de un mes, la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., se realizó por microscopía óptica normal utilizando la tinción negativa de Heine y en los animales mayores de un mes, las formas infectantes se observaron por microscopía de fluorescencia empleando anticuerpos

monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína. Esta última técnica fue la empleada para la detección de quistes de *G. duodenalis* en las heces de todos los animales. Tanto en las muestras hídricas como fecales se observaron mayores concentraciones de formas parasitarias en primavera y verano que en otoño e invierno. El porcentaje de rebaños infectados por ambos enteropatógenos fue elevado en todas las épocas del año y significativamente mayor ( $P<0,05$ ) en primavera respecto al invierno. Sólo se detectó un incremento significativo ( $P<0,05$ ) en el número de animales con cryptosporidiosis en primavera respecto al invierno.

Paralelamente, en cada estación del año las muestras de agua (50 l) se filtraron en 22 puntos de la cuenca principal (incluyendo cinco áreas recreativas), en el nacimiento y desembocadura de los tres afluentes más importantes y en la desembocadura de un afluente secundario. Las muestras se procesaron empleando técnicas basadas en el método 1623 de la USEPA (2005). A lo largo del año, se detectaron formas infectantes de ambos protozoos en los 29 puntos muestreados y también se observó mayor concentración en primavera y verano que en otoño e invierno. Para la identificación de especies y genotipos en muestras de aguas, se procedió a la amplificación y secuenciación de los genes 18S SSU ARNr (*Cryptosporidium* spp.) y  $\beta$ -giardina (*Giardia* spp.). Se detectó *C. andersoni*, *C. hominis* y *C. parvum* y los genotipos A-I, A-II y E de *G. duodenalis*.

En este estudio, se confirma la elevada prevalencia de la cryptosporidiosis y de la giardiosis en las explotaciones de ganado bovino estudiadas y la contribución de estos animales a la contaminación de la cuenca hidrográfica.

## 2. CONTAMINACIÓN DEL AGUA CON FORMAS INFECTANTES DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. Y *GIARDIA DUODENALIS*. RIESGO EN SANIDAD ANIMAL Y EN SALUD PÚBLICA.

### Artículo 2.1.

---

**Título:** Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*.

**Autores:** Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M.

**Revista:** *Water Research*, 42: 3528-3538. 2008.

**Índice de impacto:** 3,587.

**Categoría temática de la revista y posición:** Ingeniería y Medio Ambiente (3 / 38), Ciencias Ambientales (13 / 163) y Recursos Hídricos (1 / 60).

---

La finalidad de este trabajo fue conocer la repercusión de las aguas residuales depuradas a la contaminación por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en una cuenca hidrográfica. Durante las diferentes estaciones del año 2007, se acudió a todas las EDARs



existentes en el sistema de explotación hidrográfica seleccionado. Se evaluó la eficiencia de cada una de las depuradoras en la reducción e inactivación de ambos enteropatógenos; también, se identificaron las especies y/o los genotipos de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. presentes tanto en el afluente como en el efluente.

Las muestras se tomaron de forma individual en el afluente (5-50 l) y en el efluente (25-50 l) mediante un sistema de filtración que utiliza filtros específicos de gomaespuma comprimidos. Previamente, se cumplimentó un cuestionario sobre las características generales de la instalación y las condiciones de mantenimiento.

Durante el estudio, se recogieron un total de 48 muestras en el afluente y otras 48 muestras en el efluente que se procesaron empleando técnicas basadas en el método 1623 de la USEPA (2005). Los ooquistes y los quistes se concentraron, se clarificaron por IMS, se detectaron mediante una técnica de IFD y se valoró la potencial viabilidad de las formas parasitarias mediante el empleo de colorantes vitales fluorogénicos (DAPI e IP). Los resultados se expresaron como el número de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *Giardia* spp. detectados por litro de agua filtrada (OPL y QPL, respectivamente). Para identificar las especies y los genotipos se procedió a la amplificación y secuenciación de los genes: 18S SSU ARNr (*Cryptosporidium* spp.) y  $\beta$ -giardina (*Giardia* spp.).

Se detectó la presencia de ambos enteropatógenos tanto en el agua de entrada como en el agua de salida de todas las depuradoras (100%), observándose que en el afluente la concentración de *Giardia* spp., en todas las muestras analizadas, fue significativamente mayor ( $P<0,05$ ) que la detectada para *Cryptosporidium* spp. Sorprendentemente, en los efluentes se observaron concentraciones medias por litro elevadas; así, los resultados obtenidos para *Cryptosporidium* spp. estuvieron comprendidos entre 2-390 OPL mientras que en el caso de *Giardia* spp. estos valores oscilaron entre 79-2.469 QPL. Además, se comprobó que al menos un 87,0% de los ooquistes y un 90,0% de los quistes eliminados a la cuenca hidrográfica permanecen potencialmente viables tras los diferentes procesos de tratamiento aplicados en las EDARs.

Los resultados de caracterización molecular de las muestras analizadas del afluente y del efluente confirmaron la presencia de especies y genotipos de origen humano y animal. Así, se identificaron tres especies de *Cryptosporidium* (*C. andersoni*, *C. hominis* y *C. parvum*) y una única especie de *Giardia* (*G. duodenalis*), aunque se observaron dos genotipos: A (subtipos A-I y A-II) y E, de esta especie.

En consecuencia, es necesario elaborar planes de control integral para *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en los efluentes de las EDARs, incidiendo especialmente

en aquellas que vierten sus aguas tratadas a cuencas hidrográficas, con el fin de proteger la salud animal y humana.

**Artículo 2.2.**

-----  
**Título:** Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water.

**Autores:** Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M.

**Revista:** *Science of the Total Environment*, 405: 45-53. 2008.

**Índice de impacto:** 2,579.

**Categoría temática de la revista y posición:** Ciencias Ambientales (33 / 163).  
-----

La presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y de quistes de *G. duodenalis* en los suministros de agua es un problema importante de salud pública a nivel mundial, ya que ambas formas parasitarias superan sin dificultad los sistemas de depuración. La amplia legislación existente en numerosos países para el control y la vigilancia de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*, confirma el interés de las Autoridades Sanitarias y la Comunidad Científica Internacional por abordar estudios que impliquen un mayor conocimiento de estas enfermedades. Ante la ausencia de tratamientos eficaces y la resistencia de las formas infectantes a los desinfectantes habituales, se debe actuar de manera preventiva.

En este estudio los autores determinaron la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *G. duodenalis* en el afluente y en el efluente de 16 ETAPs ubicadas en una cuenca hidrográfica. Además, en este trabajo se estimó la eficiencia de las ETAPs en la reducción e inactivación de las formas infectantes de ambos protozoos y se identificaron las especies y los genotipos de *Cryptosporidium* y *G. duodenalis* en el afluente y en el efluente de las potabilizadoras. El estudio se llevó a cabo durante la primavera, verano, otoño e invierno de 2007. En cada estación del año y en cada una de las ETAPs, se filtró agua en la zona de captación (50-100 l) y del efluente tratado (100 l) usando filtros específicos. Se procesaron un total de 128 muestras. Las formas parasitarias se concentraron, se clarificaron por IMS, se detectaron mediante IFD y se valoró la potencial viabilidad mediante el empleo de colorantes vitales fluorogénicos (DAPI e IP). Para identificar las especies y los genotipos se procedió a la amplificación y secuenciación de los genes: 18S SSU ARNr (*Cryptosporidium* spp.) y  $\beta$ -giardina (*Giardia* spp.). Al considerar los afluentes de las 16 ETAPs, los valores obtenidos para *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* oscilaron entre 0-10,5 OPL y 1-12,8 QPL, respectivamente. En los efluentes, los resultados obtenidos para *Cryptosporidium* spp. estuvieron comprendidos entre 0-3 OPL mientras que en el caso de *G. duodenalis* estos valores oscilaron entre 0,5-4 QPL. Para ambos enteropatógenos, el mayor número de formas

infectantes se identificó durante la primavera y el verano. La interpretación de los resultados obtenidos tras la realización de la técnica de inclusión/exclusión de colorantes vitales fluorogénicos, en las muestras recogidas de los efluentes, ofreció un porcentaje medio de viabilidad del 85,0% para *Cryptosporidium* spp. y del 93,0% para *G. duodenalis*. En las muestras de agua, se detectaron *C. andersoni*, *C. hominis* y *C. parvum* y los genotipos A-I, A-II y E de *G. duodenalis*. En este trabajo, se demuestra que el tratamiento más utilizado en las ETAPs (filtros de arena y cloro) no garantiza la calidad del agua de bebida, una situación que representa un problema importante para la sanidad humana y animal. En consecuencia, son necesarios programas oficiales, hasta la fecha inexistentes en España, de vigilancia y control de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en las plantas potabilizadoras.

### Artículo 2.3.

**Título:** *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain.

**Autores:** Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; González-Warleta, M.; Mezo, M.

**Revista:** *Water Research*, 44: 5887-5896. 2010.

**Índice de impacto:** 4,546.

**Categoría temática de la revista y posición:** Ingeniería y Medio Ambiente (4 / 45), Ciencias Ambientales (11 / 193) y Recursos Hídricos (1 / 76).

En este artículo se realizó un estudio transversal con el fin de determinar la concentración media de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. por litro y quistes de *Giardia* spp. por litro en áreas recreativas fluviales (ARFs; n=28), en Estaciones de Tratamiento de Agua Potable (ETAPs; n=52) y en Estaciones Depuradoras de Agua Residual (EDARs; n=50) en Galicia. Se filtró agua en las ARFs (50 l) y tanto en el afluente (50-100 l) como en el efluente (100 l) de cada una de las ETAPs y EDARs seleccionadas. Se procesaron un total de 232 muestras que se concentraron, se clarificaron por IMS y las formas parasitarias se detectaron mediante una técnica de IFD. Además, se valoró la potencial viabilidad de los ooquistes y de los quistes mediante el empleo de colorantes vitales fluorogénicos (DAPI e IP). En las áreas recreativas analizadas, se observaron formas infectantes de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en 16 (57,1%; 1-60 OPL) y 17 (60,7%; 1-160 QPL) muestras, respectivamente. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ambos enteropatógenos. Al considerar los afluentes de las plantas potabilizadoras, se detectaron ooquistes en 21 ETAPs (40,4%; 1-13 OPL) y se observaron quistes en 22 ETAPs (42,3%; 1-7 QPL). En los efluentes, se identificaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 17 ETAPs (32,7%; 1-4 OPL) y quistes de *Giardia* spp. en 19 ETAPs (36,5%; 1-5 QPL). Las concentraciones más elevadas se obtuvieron en las EDARs; así, en el afluente se detectaron

ooquistes en 29 (58,0%; 1-80 OPL) y quistes en 49 (98,0%; 2-14.400 QPL). Finalmente, se observó *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en los efluentes de 32 EDARs (64,0%; 1-120 OPL) y 48 EDARs (96,0%; 2-6.000 QPL), respectivamente.

Independientemente de su procedencia (ARF, ETAP o EDAR), en las muestras analizadas se observó un porcentaje medio de viabilidad del 90,0% para *Cryptosporidium* spp. y del 95,0% para *Giardia* spp. Se comprobó que en las EDARs situadas en la franja costera los efluentes vertían directamente al mar; mientras que las depuradoras de zonas interiores eliminaban sus aguas directamente al río; lo que representa un riesgo importante para la salud humana y animal.

Estos resultados muestran una amplia distribución de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en el ambiente; la ineficiencia de las ETAPs y EDARs en la reducción e inactivación de ambos protozoos; la necesidad de elaborar planes de control para vigilar la presencia, la potencial viabilidad y la infectividad de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en los efluentes tanto de las potabilizadoras como de las depuradoras.

## **UNIDAD TEMÁTICA DE LAS PUBLICACIONES**



Las publicaciones que se presentan en este trabajo de Tesis Doctoral constituyen una unidad temática. Todas ellas están coordinadas con la finalidad de avanzar en el conocimiento epidemiológico y molecular de dos enfermedades parasitarias –cryptosporidiosis y giardiosis– de importancia en sanidad animal y humana.

Ambas protozoosis tienen una notable repercusión económica en los rumiantes domésticos, especialmente en las ganaderías bovina y ovina, a lo que se debe añadir su interés sanitario puesto que actualmente constituyen uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo, hasta el punto de considerarse como parasitosis re-emergentes. Son zoonosis de transmisión fecal-oral producida tras la ingestión de ooquistes y de quistes excretados en las heces de animales o del hombre. Aunque las infecciones pueden ocurrir de forma esporádica, son cada vez más frecuentes los brotes epidémicos, generalmente de transmisión hídrica, asociados a aguas superficiales y de la red de abastecimiento público, incluso filtradas y tratadas.

La importancia de estos patógenos se ve agravada por dos circunstancias: la extraordinaria resistencia de las formas infectantes a los antisépticos y desinfectantes habitualmente empleados y la ausencia, en el caso de la cryptosporidiosis, de un tratamiento eficaz. Por tanto, el control se debe dirigir principalmente a las explotaciones ganaderas aunque también hacia los animales silvestres que pueden propiciar el mantenimiento, diseminación y perpetuación de ambas infecciones, incluso en ausencia de animales domésticos.

En los últimos años, el uso de técnicas de biología molecular ha permitido confirmar la existencia de un gran número de especies y genotipos de *Cryptosporidium* y *Giardia* en diferentes clases de vertebrados; por lo que, estas técnicas son herramientas imprescindibles para investigar la dinámica de la transmisión de la cryptosporidiosis y de la giardiosis. En definitiva, la atención de los investigadores se centra en conocer mejor la epidemiología de estas enfermedades con el fin de disminuir en lo posible la transmisión y la contaminación del suelo y del agua, al tiempo que se modifican y optimizan los sistemas de depuración para eliminar a estos parásitos.

Los hallazgos obtenidos en los artículos que se presentan contribuyen notablemente a profundizar en el conocimiento de la epidemiología de estas enfermedades parasitarias en animales domésticos y silvestres. Además, suponen los primeros trabajos que han permitido evaluar la contribución de estos animales –juveniles y adultos– a la contaminación de las aguas superficiales por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en zonas eminentemente ganaderas y de caza. Asimismo, suponen los primeros estudios amplios que han determinado el grado de contaminación de las aguas –residuales, potables y superficiales– por ambos protozoos y que

han estimado la eficiencia de las EDARs y ETAPs en la reducción e inactivación de las formas infectantes de ambos enteropatógenos. En las publicaciones que se presentan, también se han llevado a cabo numerosos estudios de caracterización molecular de aislados de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. procedentes de animales y de aguas, por lo que se muestran las especies y los genotipos más prevalentes en Galicia. Por tanto, estos artículos suponen los primeros avances en una línea de investigación destinada a controlar, al máximo posible, la transmisión hídrica de ambas zoonosis parasitarias en Galicia.

De la lectura detallada de los artículos que constituyen el cuerpo de la Tesis Doctoral, se desprende un proceso dinámico de avance en los conocimientos epidemiológicos de la cryptosporidiosis y de la giardiosis. Los seis trabajos publicados se han dividido en dos grupos. El primero, constituido por tres publicaciones, muestra datos de prevalencias e intensidades de infección de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en animales domésticos –bovinos y ovinos– y silvestres –corzos y jabalíes– en diferentes zonas y estaciones del año en Galicia. En estos estudios, se ha valorado la contribución de estos animales a la contaminación de aguas superficiales por ambos protozoos. El segundo grupo de trabajos, constituido también por tres publicaciones, muestra resultados de la contaminación de las aguas –residuales, potables y superficiales– con formas infectantes de ambos enteropatógenos en una cuenca hidrográfica y en distintas épocas del año en Galicia. Asimismo, se evaluó la eficiencia de todas las plantas depuradoras y potabilizadoras existentes en la cuenca hidrográfica seleccionada sobre la reducción e inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *G. duodenalis*. Estos conocimientos se utilizaron para llevar a cabo un estudio más extenso en EDARs y ETAPs de 55 municipios gallegos. La obtención de estos resultados ha permitido evaluar el riesgo potencial de transmisión hídrica de ambas enfermedades parasitarias en estas zonas de Galicia desde el punto de vista de la sanidad animal y la salud pública. Una vez caracterizados los riesgos y teniendo en cuenta la información aportada en esta Tesis Doctoral, podremos incidir sobre otros mecanismos de transmisión, con la finalidad de disminuir significativamente el impacto ambiental de ambas parasitosis, especialmente en zonas agrarias y ganaderas; por ejemplo, aplicación de purines como fertilizante, reutilización de las aguas residuales depuradas o uso de los lodos de EDARs en agricultura.

La unidad temática de los artículos presentados en esta Tesis Doctoral no se justifica únicamente por los resultados obtenidos, sino que el diseño experimental de todos ellos está pensado para que formen un bloque de conocimiento. De entre las fuentes de contaminación y los posibles mecanismos de transmisión de la cryptosporidiosis y la giardiosis se eligieron los animales y las aguas ya que Galicia es una región geográfica con elevado censo ganadero, con una distribución de la población muy dispersa y con abundantes fuentes de agua. En el



capítulo de material y métodos de todas las publicaciones se comprueba que en todos los estudios se utilizó la microscopía óptica –normal y fluorescencia– ya que es la única técnica que permite la identificación de las formas parasitarias de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. Sin embargo, a medida que avanzábamos en el trabajo hemos complementado esta técnica de identificación morfológica con técnicas de identificación molecular basadas en la PCR. La caracterización molecular de aislados de ambos parásitos procedentes de los animales domésticos y silvestres así como de las aguas nos ha permitido describir mejor la dinámica de transmisión de ambas enfermedades parasitarias en Galicia.

La normativa actual de la Universidad de Santiago de Compostela establece que las Tesis Doctorales presentadas en el formato de compendio de publicaciones solo deben incluir artículos que estén aceptados y publicados. Además, se exige la elaboración de una discusión conjunta de los diferentes trabajos publicados así como unas conclusiones y bibliografía comunes. Por tanto, de acuerdo con la reglamentación de la Universidad de Santiago de Compostela se ha estructurado esta segunda parte de la memoria de Tesis Doctoral con la finalidad de cumplir con los requisitos legales.



## **RESUMEN Y COPIA DE LAS PUBLICACIONES**



***Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain).**

Castro-Hermida, J.A.; [García-Presedo, I.](#); Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M.

***Science of the Total Environment*, 409: 2451-2459. 2011.**



El objetivo de este estudio fue investigar la dispersión ambiental de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en dos áreas (costera e interior) de Galicia. En la zona costera, se examinaron 323 animales domésticos y 312 silvestres. En la zona interior, se muestrearon 703 animales domésticos y 148 silvestres. Además, en cada área se analizó el afluente y efluente de 12 ETAPs y 12 EDARs. La prevalencia de la cryptosporidiosis y giardiosis en los animales de la zona costera fue de 9,2% y 15,9% respectivamente, mientras que en los animales de la zona interior, la prevalencia fue significativamente mayor ( $P<0,05$ ) para ambas parasitosis: 13,7% y 26,7% respectivamente. En la zona costera, se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en los afluentes y efluentes de 2/12 (16,6%) ETAPs y 8/12 (66,6%) EDARs, mientras que los quistes de *G. duodenalis* se observaron en la entrada y salida de 3/12 (25,0%) ETAPs y 12/12 (100%) EDARs. En las ETAPs del interior, se detectaron ooquistes en 9/12 (75,0%) afluentes y 7/12 (58,3%) efluentes, mientras que los quistes se observaron en 7/12 (58,3%) afluentes y 4/12 (33,3%) efluentes. Además, los quistes de *G. duodenalis* se identificaron en muestras de aguas residuales tratadas y sin tratar de todas las EDARs (100%) analizadas. Las especies y los genotipos más frecuentemente detectadas en los animales y en las aguas de la zona costera fueron: *C. hominis*, *C. parvum* y *G. duodenalis* genotipos A (I y II) y E, mientras que en la zona del interior, *C. andersoni*, *C. parvum* y *G. duodenalis* genotipos A (I y II), B y E fueron los más comúnmente identificados.







Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scitotenv](http://www.elsevier.com/locate/scitotenv)

## *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain)

José Antonio Castro-Hermida<sup>a,\*</sup>, Ignacio García-Presedo<sup>a</sup>, André Almeida<sup>b,c</sup>, Marta González-Warleta<sup>a</sup>, José Manuel Correia Da Costa<sup>b,c</sup>, Mercedes Mezo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Instituto Galego de Calidade Alimentaria, Xunta de Galicia, Carretera AC-542 de Betanzos a Mesón do Vento, Km 7.5, CP 15318, Abegondo (A Coruña), Spain

<sup>b</sup> Centro de Imunología e Biología Parasitaria, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Rua de Alexandre Herculano, 321, 4000-055 Porto, Portugal

<sup>c</sup> Centro de Estudos de Ciência Animal, Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares, Universidade do Porto, Rua D. Manuel II, Apt 55142, 4051-401 Porto, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 November 2010  
Received in revised form 7 March 2011  
Accepted 8 March 2011  
Available online 13 April 2011

#### Keywords:

*Cryptosporidium* spp.  
*Giardia duodenalis*  
Environmental contamination  
Water quality  
Public health

### ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the environmental dispersal of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two distinct areas (coastal and inland) in Galicia (NW Spain). Faecal samples were collected from healthy asymptomatic domestic (cows and sheep) and wild animals (deer and wild boars) in the selected areas. In each of the selected areas, samples of untreated water (influent) and of treated water (final effluent) were collected from each of the 12 drinking water treatments plants (DWTPs) and 12 wastewater treatment plants (WTPs) under study. Analysis of a single sample from each of the 635 (coastal) and 851 (inland) domestic and wild animals selected at random revealed that the prevalences of cryptosporidiosis and giardiasis in coastal area were 9.2% and 15.9% respectively, and in inland area, 13.7% and 26.7% respectively. In the coastal area, *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected in influent and effluent samples from 2/12 (16.6%) DWTPs and 8/12 (66.6%) WTPs, while *G. duodenalis* cysts were detected in influent and effluent samples from 3/12 (25.0%) DWTPs and 12/12 (100%) WTPs. The concentrations were notably higher in WTPs; the mean parasite concentrations in the final treated effluent were 10 oocysts per litre and 137.8 cysts per litre for *Cryptosporidium* and *Giardia*, respectively. The mean concentration of *G. duodenalis* cysts per litre was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the mean concentration of *Cryptosporidium* spp. oocysts per litre in both the influent and the effluent samples from all the treatment plants. In the coastal area, *C. parvum*, *C. hominis* and *G. duodenalis* assemblages A (I and II) and E were most frequently detected. In the inland area, *C. parvum*, *C. andersoni* and *G. duodenalis* assemblages A (I and II), B and E were most frequently identified.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* are significant causes of disease and morbidity in humans and a wide range of domestic and wild animals (Thompson, 2000; Fayer, 2004). The prevalence of these protozoans in domestic ruminants has been investigated in several studies (Fayer et al., 2000b; Lefay et al., 2000; Castro-Hermida et al., 2005, 2007a,b). Infections by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* have been associated with economic losses, through the occurrence of diarrhoea in productive animals, and also death of animals, especially neonatal domestic ruminants (O'Handley et al., 1999; Wade et al., 2000; Castro-Hermida et al., 2006). The (oo)cysts survive for long periods in the environment, and are important waterborne pathogens (Smith and Rose, 1990; Slifko et al., 2000; Smith et al., 2007). Numerous studies have reported the presence of infective form of both parasites in different types of water (surface, drinking water and wastewater) and

food (Gómez-Couso et al., 2005, 2006; Montemayor et al., 2005; Carmena et al., 2007; Castro-Hermida et al., 2009) but the role of the livestock and wild animals in the maintenance of these infections in the environment has been hardly studied.

There are, however, large phylogenetic and physiological differences between the genera, and considerable differences have been found in the action of chemotherapeutic agents against these parasites. Molecular biology studies continue to provide insights into the taxonomy and epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis*, and previously unrecognised differences in disease, symptomatology, zoonotic potential, risk factors and environmental contamination have been identified (Fayer et al., 2000a; Fayer, 2010; Cacciò et al., 2010; Graczyk et al., 2010).

Human cryptosporidiosis is known to be caused by *C. andersoni*, *C. baileyi*, *C. canis*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. parvum* and *C. suis* (Fayer, 2010). In developing countries, more than 70% of *Cryptosporidium* infections in children are caused by *C. hominis* whereas *C. parvum* is the main species reported in developed countries (Xiao, 2010). Differences in clinical signs have been linked to particular species or sub-genotypes of *Cryptosporidium*, and underline the importance of

\* Corresponding author. Tel.: +34 981 647 902x248; fax: +34 981 673 656.  
E-mail address: jose.antonio.castro.hermida@xunta.es (J.A. Castro-Hermida).

understanding parasite genetics in pathogenesis, clinical presentation and disease (Cama et al., 2007). Increasing evidence of genetic sub-structuring in *C. parvum* suggests that it may actually consist of more than one species that adopt distinct anthropologic and zoonotic cycles (Morrison et al., 2008).

With respect to *G. duodenalis*, seven genetically distinct but morphologically identical lineages, assemblages A–G are comprised within this species. Assemblages A and B infect most vertebrates but are the only two assemblages known to infect humans and are therefore considered zoonotic. Assemblages C–G are considered host-specific. Assemblages C and D predominantly occur in dogs, Assemblage E in hoofed livestock, Assemblage F in cats and Assemblage G in rats (Cacciò and Ryan, 2008). Genetic distances equivalent to those that distinguish some protistan genera separate these assemblages (Cacciò and Sprong, 2010), and giardiasis can also occur in marine vertebrates, which may pose a health threat to both marine and terrestrial life (Lasek-Nesselquist et al., 2010). Nevertheless, the large genetic variation originally described at the protein level in axenic isolates of *Giardia* has been fully corroborated by DNA-sequence data from several loci (Cacciò et al., 2008; Geurden et al., 2008). The exact recognition of genetic variants within assemblages B, C, D and E appears to be influenced by a higher frequency of allelic heterogeneity than in assemblages A and F. Investigation of the mechanism(s) responsible requires further research.

The presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and of *G. duodenalis* cysts in water supplies is a serious public health problem, as both of these parasitic forms easily survive treatment processes (Wicki et al., 2009; Chalmers et al., 2010; Cummins et al., 2010; Smith and Nichols, 2010). The enormous quantity of oocysts/cysts shed by infected people and animals during the infectious period, the low rate of sedimentation of these parasitic stages in reservoirs and other water deposits, the practise of spreading agricultural slurry (which is often not adequately matured) on pasture land, and the high resistance of the infective stages to environmental conditions combine to make the presence of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* increasingly ubiquitous, and make quantification of the primary sources of both parasites in the environment essential (Adam, 2001; Ralston et al., 2003; Trout et al., 2005; Graczyk et al., 2000, 2008). Legislation existing in several countries, as regards the control and monitoring of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis*, reflects the interest that the health authorities and the scientific community have in undertaking studies that will provide a better understanding of this disease. In this way, strategies can be designed for the control of infections in populations at risk, with the aim of reducing or minimising the factors that lead to the introduction, transmission and dispersal of these parasite zoonoses (Karanis et al., 2006; Castro-Hermida et al., 2008; Mason et al., 2010; Yoder and Beach, 2010).

The aims of the present study were therefore to determine the environmental dispersal of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in two distinct areas (I = coastal and II = inland) in Galicia (NW Spain). For this purpose, the prevalence and intensity of infection by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* was studied in livestock (cattle and sheep) and wild animals (deer and wild boar) in these selected areas. In each of the areas, the mean concentrations (per litre) of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts in the influent and final effluent from drinking water treatments plants (DWTPs) and wastewater treatment plants (WTPs) were also determined. Finally, the species and genotype of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* present in animals and water samples were identified by means of a molecular assay.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Site selection and description of study areas

The present study was carried out in two different areas in Galicia, NW Spain (Fig. 1). Coastal area comprises 22 municipalities covering a total area of 1649.6 km<sup>2</sup>. The area is characterised by tourist, urban and

industrial zones. The area includes twelve small hydrographical basins that are sources of water for drinking water treatment plants (DWTPs) that provide daily drinking water to more than 213,862 inhabitants (~130 inhabitants/km<sup>2</sup>). The area of land dedicated to agricultural is small, and approximately 25% of the useful agricultural land is used as grassland. The number of livestock in the area is 26,304 (~16 cattle/km<sup>2</sup>) (Anonymous, 2004). There are several areas for hunting deer and wild boar close to the farms. Most of the final effluents (68%) from the wastewater treatment plants (WTPs) are discharged into the sea and fewer (only 32%) are discharged into the hydrographical basins.

Inland area also consists of 22 municipalities, and covers an area of 3159.2 km<sup>2</sup>. However it is a non-touristic area characterised by mountainous and rural zones. There is a significant level of farming activity in the area, predominantly cattle farming (livestock census 148,368, i.e. 47 cattle/km<sup>2</sup>). A large area of the land is dedicated to agriculture, and grasslands occupy more than 50% of the useful agricultural land. Moreover, the livestock usually graze throughout the year and farmers spread agricultural slurry on pasture land. Moreover, all of the final effluents from the WTPs are discharged into the three hydrographical basins in the area, which include several recreational zones, river beaches and pumping areas for drinking water treatment plants (DWTPs), which supply drinking water to a population of 110,196 (~35 inhabitants/km<sup>2</sup>). The area also includes zones for deer and wild boar hunting.

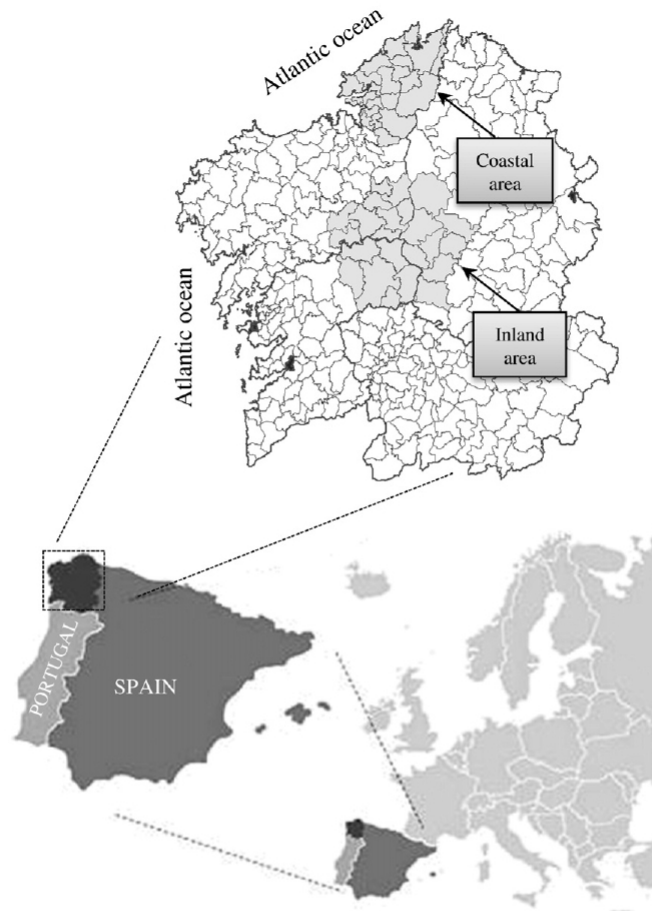
Both areas lacked barriers (i.e., buffer zones and vegetation) to prevent contamination of the water and included several zones declared Sites of Community Importance (SCI), by the European Council Habitats Directive (Council Directive 92/43/EC, 1992), so that the environmental impact of faecal contamination can be important. In each of the areas, the following were sampled: cattle (neonatal calves, heifers and cows), sheep (neonatal lambs and adult sheep) and wild animals killed during the hunting season (deer and wild boar). A sample of untreated water (influent) and another of treated water (final effluent) were collected from each of 12 DWTPs and 12 WTPs at the same time as the samples from the animals.

The drinking water is treated in conventional water plants. The treatment includes coagulation, flocculation, and clarification through sedimentation, filtration and disinfection by chlorination. However, some small communities use surface water supplies after minimal treatment, usually only chlorination. Drinking water sources are generally open to varied recreational uses, including swimming.

The main processes in the selected WTPs consist of primary treatment (pumping, screening, storage and/or preconditioning) and secondary treatment (coagulation & flocculation, sedimentation and filtration). Some plants also carry out tertiary treatments (UV or ozone). Outbreaks of infection may occur during malfunctioning of treatment plants, which enables the parasites to bypass the treatment processes more easily. Wastewater treatment plants are important potential sources of contamination in watersheds if the effluents are not treated appropriately before being discharged into the sea, close to rivers or ponds.

### 2.2. Detection and quantification of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* (oo)cysts from faecal samples

Faecal samples were collected from the following animals: in coastal area: 187 cattle (12 neonatal calves, 85 heifers and 90 cows), 136 sheep (25 neonatal lambs and 111 adult sheep) and 312 wild animals (137 deer and 175 wild boars) were sampled; in inland area, 462 cattle (37 neonatal calves, 172 heifers and 253 cows), 241 sheep (45 neonatal lambs and 196 adult sheep) and 148 wild animals (44 deer and 104 wild boars) were sampled. Domestic animals were selected at random and the only possible restriction was whether the farmers consented to the study. Sampling of these animals was carried out throughout the years 2008–2009. Wild animals came from those shot during the Official hunting seasons (August–January) of both



**Fig. 1.** Geographic map of the investigated areas and location of the sampling sites in Galicia (NW Spain). Coastal area including tourist, urban and industrial zones. Inland area mountainous (non-touristic) including rural, agricultural and livestock zones.

years. Individual faecal samples were taken directly from the rectum of each animal, using sterile plastic gloves or sterile rectal swabs, and the sampling date, origin, age and identification number were recorded for each animal. In the case of wild animals, sampling was carried out during the evisceration.

Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in faecal samples from neonatal calves and lambs (<1 month) was carried out by the direct examination method of Heine (1982). The intensity of infection was evaluated semiquantitatively according to the average number of oocysts in 50 randomly selected microscopic fields at 1000× magnification. The categories established were 0: absence of oocysts; 1: ≤1 oocyst per field; 2: 2–5 oocysts per field; 3: 6–10 oocysts per field and 4: >10 oocysts per field. In the remaining animals, *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected by a direct immunofluorescence technique with monoclonal antibodies (IFAT) (Aqua-Glo G/C Direct, FL, Comprehensive Kit, Waterborne, Inc. New Orleans, USA). The same technique was also used for detection of *G. duodenalis* cysts in all animals. Briefly, two grammes of faeces were diluted in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, and filtered through a sieve (mesh size: 45 μm) into conical centrifuge tubes. Diethyl ether was then added at a proportion of 2:1;

the tubes were shaken vigorously and centrifuged at 1000×g for 5 min at 4 °C and the top three layers decanted off. The sediment was removed and washed in PBS by centrifuging at 1000×g for 5 min at 4 °C. Aliquots of the sediment (100 μl) were fixed in acetone on slides at 4 °C for 10 min and processed with a commercial kit, which contains fluorescein isothiocyanate-conjugated monoclonal antibodies. The whole volume of sample was observed by fluorescence microscopy at 400× magnification. The number of (oo)cysts per gramme of faeces was calculated as follows: number of (oo)cysts identified/(volume of sample examined (ml) × weight of faeces (g)). The sensitivity of the technique was 20 (oo)cysts per gramme of faeces.

### 2.3. Detection and quantification of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* (oo)cysts from water samples

In each of the selected areas, two samples (between 25 l and 100 l), one of untreated water (influent) and other of treated water (final effluent), were collected from each of the 12 DWTPs and WTPs sampled, respectively. The holding times of each step in the process were taken into account during sampling so that the water samples



and wastewater were analysed at the same stage of the treatment process.

The 96 samples were taken immediately to the laboratory and processed with the Filti-Max Automatic System (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA). Filtration cartridges were set up according to the manufacturer's instructions, and all samples were filtered at recommended flow rates. The filter elution and final concentration of the sample were determined with the same equipment, and by following the manufacturer's instructions. Then, the Immunomagnetic Separation Technology (IMS) procedure was performed as described in US EPA method 1623 (USEPA, 2001). Finally, the samples were dried, fixed in acetone, and 50 µl of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-*Cryptosporidium* sp. and anti-*Giardia* sp. MABs (Aqua-Glo; Waterborne Inc., New Orleans, La) were placed in each well. The slides were placed in a humidified chamber, incubated at 37 °C for 45 min, and excess FITC-MAB was aspirated. Any remaining FITC-MAB was removed by adding 50 µl of PBS to each well, leaving the slides for 5 min, and aspirating the excess PBS. A 5 µl aliquot of propidium iodide (PI) solution (1 mg/ml in distilled water) was placed in each well. The slides were left at room temperature for 15 min, and excess PI solution was removed by washing the slides twice in PBS and once in distilled water. The slides were placed in the dark until dry, then a 10 µl aliquot of mounting medium (2% diazabicyclooctane [DABCO] in 60% glycerol 40% PBS) was added to each well, and the slides were sealed for subsequent examination under epifluorescence optics, as described in method 1623 (USEPA, 2001). *Cryptosporidium* spp. oocysts were identified on the basis of their size, shape, and the presence of a suture on the oocyst wall, at a magnification of 400×. *Giardia* spp. cysts were identified by their size, shape and the pattern and intensity of immunofluorescence assay staining (i.e., bright green fluorescence of the cyst wall). Parasites in each slide well were enumerated, and the mean numbers were used to extrapolate to concentrations of parasites per litre of sample. Positive and negative controls were used, as recommended in Method 1623. All calculations were performed taking into account the mean percentage recoveries determined by McQuinn and Clancy (2003) for *Cryptosporidium* oocysts (50% ± 13%) and *Giardia* cysts (41% ± 9%) using Filti-Max system and IMS. A simultaneous study of uptake/exclusion of fluorogenic PI vital dye was carried out. The technique was based on the uptake of PI fluorogenic vital dye by dead oocysts, not by live oocysts (Rose et al., 1989; Campbell et al., 1992). The (oo)cysts were therefore counted according to whether they were PI-positive (PI+: permeable and presumably dead) or PI-negative (PI–: impermeable and presumably viable).

#### 2.4. DNA extraction, gene amplification and sequencing for animal and water samples

For selected samples that contained relatively high concentrations of nucleated (oo)cysts, the parasites were isolated by IMS (Dynabeads® GC-Combo, Invitrogen Dynal, A.S., Oslo, Norway), following the manufacturer's instructions, although the beads were washed several times before the beads and parasites were dissociated, and the isolated parasites were resuspended in Tris-EDTA buffer. DNA was isolated with a QIAamp® DNA Mini kit (QIAGEN GmbH, Germany), according to the manufacturer's instructions.

*Cryptosporidium* species and genotypes were determined by a technique based on PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of the small-subunit (SSU) ribosomal RNA gene (18S SSU rRNA). A two-step nested PCR protocol was used to amplify an 830 bp fragment of the 18S SSU rRNA gene, with primers 5'-TTCTA-GAGCTAATACATGCG-3' and 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAG GA-3' for primary PCR and 5'-GGAAGGGTTGTATTATTAGATAAAG-3' and 5'-AAGGAGTAA GGAACAACCTCC A-3' for secondary PCR (Xiao et al., 1999). The primary PCR mixture contained 1× PCR buffer, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM (each) deoxynucleoside triphosphate, 100 nM (each) primer, 2 units of Taq polymerase (New England BioLabs), and 10 µl of purified DNA in a

final volume of 50 µl. Each cycle (×45) consisted of 94 °C for 40 s, 55 °C for 40 s, and 72 °C for 1 min 30 s after an initial hot start at 94 °C for 4 min and ending with 72 °C for 7 min. A secondary PCR product was then amplified from 5 µl of the primary PCR. The secondary PCR mixture was identical except that the concentration of MgCl<sub>2</sub> was 3 mM. Each cycle (×45) consisted of 94 °C for 40 s, 55 °C for 40 s, and 72 °C for 1 min after an initial hot start at 94 °C for 4 min and ending with 72 °C for 7 min.

For molecular typing of *G. duodenalis*, a semi-nested PCR and partial sequencing of the β-giardin locus were performed (Cacciò et al., 2002). In the primary reaction, a 753 bp fragment was amplified with the forward primer G7 5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGACGTGC-3' and the reverse primer G759 5'-GAGCCCGCCTGGATCTTCGA-GACGAC-3'. In the sequential semi-nested PCR reaction, a 384 bp fragment was amplified with the forward inner primer G376 5'-CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA-3' and the reverse primer G759, as previously described by Cacciò et al. (2002). The PCR mix contained 1× PCR buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM (each) deoxynucleoside triphosphate, 200 nM (each) primer, 2.5 units of Taq polymerase (New England BioLabs), and 5 µl of purified DNA as template for primary steps and 2.5 µl of primary PCR product for secondary steps, in a final volume of 50 µl. The PCR was performed as follows: an initial denaturation step of 94 °C for 5 min, 40 cycles of 30 s at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 60 s and a final extension cycle of 7 min at 72 °C.

In all cases, for each reaction, a negative (water) and a positive control were added. The PCR products were submitted to 1.2% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and the gel image recorded under UV light. Gel images were captured with a gel documentation system (Gel Doc XR system, BioRad).

Following successful PCR, the products were purified (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare Europe GmbH, Germany) and sequenced on both strands (MWG Biotech, Germany). Chromatograms and sequences were examined with Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) and BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>). Sequence searches were conducted with BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

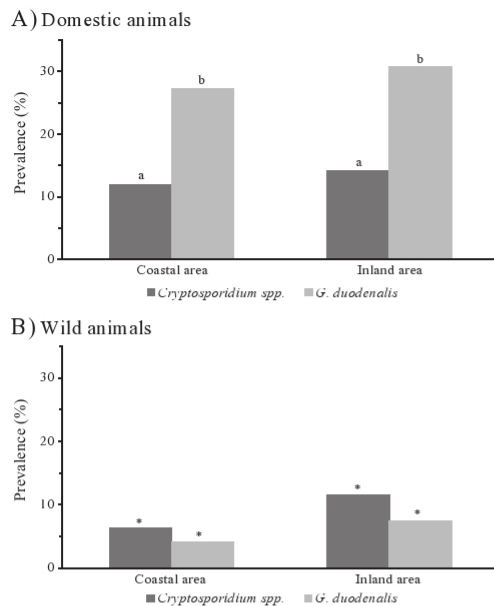
#### 2.5. Statistics

The prevalence and intensity of infection determined in the faecal samples were compared by a test of comparison of proportions and the Kruskal–Wallis test (non-parametric ANOVA). In animals <1 month, due to the large number of *Cryptosporidium* oocysts excreted, it was not possible to establish the intensity of infection as the number of oocysts per gramme of faeces. Therefore, only data from adult animals were included in the statistical analysis. For the water samples, concentrations of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* were not normally distributed (Kolmogorov–Smirnov test), so that parasite concentrations at different points were also compared by Kruskal–Wallis test and Dunn's Multiple Comparison test. Analyses were carried out with GraphPad InStat® for Windows, version 3.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), and differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in domestic and wild animals

Analysis of a single sample of each of the 635 (coastal area) and 851 (inland area) domestic and wild animals revealed that 59 and 101 (coastal area) and 117 and 227 (inland area) animals were shedding *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts, respectively, i.e. in coastal area the prevalences of cryptosporidiosis and giardiasis were 9.2% and 15.9% respectively, while in inland area, there were



**Fig. 2.** Prevalence of cryptosporidiosis and giardiasis for domestic and wild animals in coastal and inland areas. Mean values in the same area indicated by different letters are significantly different. Mean prevalences in different areas indicated by an asterisk are significantly different from each other.

13.7% and 26.7% respectively. The results revealed significant differences between inland and coastal areas in relation to the prevalence of both infections ( $P < 0.05$ ). Moreover, in each area the prevalence of giardiasis was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the prevalence of cryptosporidiosis (Fig. 2).

The prevalence of the infection in the domestic animals did not differ significantly between the selected areas. Nevertheless, the prevalence of both cryptosporidiosis and giardiasis in wild animals was significantly higher in the inland area than in the coastal area ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2).

In each area, the prevalence of cryptosporidiosis in neonatal calves was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in heifers and cows (Table 1). The intensity of giardiasis in neonatal calves was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in heifers and cows. Moreover, the prevalence of both infections was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in neonatal lambs than in adult sheep; however, excretion of cysts of *G. duodenalis* per gramme of faeces in sheep was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in neonatal lambs (Table 1). Although the prevalence and intensity of infection of cryptosporidiosis and giardiasis in wild animals were lower than in domestic ruminants, the results confirm that the deer and wild boar also contribute to contamination, especially in inland areas (Fig. 2 and Table 1).

### 3.2. Prevalence and concentration of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in water samples

In each of the study areas, two samples (25 l to 100 l), one of untreated water (influent) and other of treated water (final effluent), were collected from each of the 12 DWTPs and 12 WTPs. In the coastal area, *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected in influent and effluent from 2/12 (16.6%) DWTPs and 8/12 (66.6%) WTPs, while *G. duodenalis* cysts were observed in influent and effluent from 3/12 (25.0%) DWTPs and from 12/12 (100%) WTPs (Table 2A). The mean concentrations of parasites in influent and effluent samples from DWTPs were similar (Table 2A). The mean concentrations were notably higher in WTPs, with 12.2 *Cryptosporidium* spp. oocysts per litre and 414.9 *G. duodenalis* cysts per litre detected in influent samples. The mean concentration of parasites in the final treated effluent was 10 oocysts per litre and 137.8 cysts per litre (Table 2A). In both the influent and the effluent samples of WTPs, the mean concentration of *G. duodenalis* cysts per litre was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the mean concentration of *Cryptosporidium* spp. oocysts per litre.

**Table 1**

Prevalence and intensity of infection by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in domestic (cattle and sheep) and wild (deer and wild boar) animals in coastal (A) and inland (B) areas.

Animals (number)	Prevalence (%)	Oocysts per gramme of faeces		Prevalence (%)	Cysts per gramme of faeces	
		Min–Max	Mean		Min–Max	Mean
A) Coastal area						
Neonatal calves (12)	58.3 <sup>a</sup>	1–4*	2.4*	33.3	176–916	507.7 <sup>b</sup>
Heifers (85)	12.9	19–295	84.1	30.5	15–385	73.1
Cows (90)	7.7	10–46	34.8	21.1	10–128	31.9
Neonatal lambs (25)	32.0 <sup>c</sup>	2–4*	2.6*	40.0 <sup>c</sup>	3–78	20.8
Adult Sheep (111)	5.4	16–59	38.6	26.1	12–707	84.6 <sup>d</sup>
Deer (137)	5.1	2–10	6.4	5.8	5–20	9.3
Wild boar (175)	7.4	5–125	19.6	2.8	5–10	9.0
B) Inland area						
Neonatal calves (37)	62.2 <sup>a</sup>	1–4*	2*	37.8	95–5910	1492.6 <sup>b</sup>
Heifers (172)	15.7	10–782	96.6	32.5	19–15,412	719.4
Cows (253)	8.7	10–385	90.1	28.8	10–1042	94.8
Neonatal lambs (45)	40.0 <sup>c</sup>	1–3*	1.6*	44.4 <sup>c</sup>	3–110	19.7
Adult Sheep (196)	5.1	16–1484	191.4	27.0	10–1000	92.3 <sup>d</sup>
Deer (44)	11.3	7–200	46.6	13.6	5–47	13.8
Wild boar (104)	11.5	5–133	48.9	4.8	10–121	44.6

<sup>a</sup>The intensity of infection in this group was evaluated semiquantitatively according to the average number of oocysts in 50 randomly selected fields at 1000× magnification (0: absence of oocysts; 1: ≤1 oocyst per field; 2: 2–5 oocysts per field; 3: 6–10 oocysts per field and 4: >10 oocysts per field).

<sup>b</sup> The prevalence was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in heifers and cows.

<sup>c</sup> The intensity of infection was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in heifers and cows.

<sup>d</sup> The prevalence was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in adult sheep.

<sup>e</sup> The intensity of infection was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in neonatal lambs.



**Table 2**

Prevalence, range (Min–Max) and geometric mean numbers of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts in the influent and effluent samples from drinking water treatment plants (DWTPs; n = 12) and wastewater treatment plants (WTPs; n = 12) in coastal (A) and inland (B) areas.

Plant	<i>Cryptosporidium</i> spp. oocysts per litre						<i>G. duodenalis</i> cysts per litre					
	Influent			Effluent			Influent			Effluent		
	Positive samples (%)	Min–Max	Mean	Positive samples (%)	Min–Max	Mean	Positive samples (%)	Min–Max	Mean	Positive samples (%)	Min–Max	Mean
<b>A) Coastal area</b>												
DWTP	16.6	1–1	1	16.6	1–1	1	25.0	1–2	1.3	25.0	1–2	1.3
WTP <sup>a,b</sup>	66.6	1–25	12.2	66.6	1–36	10.0	100	45–1260	414.9	100	15–507	137.8
<b>B) Inland area</b>												
DWTP	75.0	1–2	1.4	58.3	1–1	1	58.3	1–3	1.4	33.3	1–1	1
WTP <sup>a,b</sup>	66.6	1–50	12.8	66.6	1–120	17.2	100	2–10,000	2751.8	100	2–2145	560.1

<sup>a</sup> The mean concentration of *G. duodenalis* cysts per litre was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the mean concentration of *Cryptosporidium* spp. oocysts per litre in both the influent and the effluent samples.

<sup>b</sup> The mean concentration of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts in the effluent from WTPs collected in inland area (A) was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in samples collected in coastal area (B).

In inland areas, *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected in 9/12 (75.0%) and 7/12 (58.3%) of DWTPs influent and effluent samples, respectively. *G. duodenalis* cysts were detected in 7/12 (58.3%) and 4/12 (33.3%) of inland area DWTPs influent and effluent, respectively. Moreover, *G. duodenalis* cysts were detected in untreated and treated wastewater samples from all WTPs (100%) (Table 2B). The mean concentration of (oo)cysts per litre in DWTPs did not differ significantly between the coastal and inland areas (Table 2). According to the results obtained for the WTPs, in inland area the mean concentration of *G. duodenalis* per litre was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the mean concentration of *Cryptosporidium* spp. per litre, both in the influent (2751.8 compared with 12.8) and effluent samples (560.1 compared with 17.2). The potential contamination of the three hydrographic basins (considering only the final effluent) was between 1 and 120 *Cryptosporidium* spp. oocysts per litre (mean 17.2) and between 2 and 2145 *G. duodenalis* cysts per litre (mean 560.1) (Table 2B).

The distribution of results by selected areas revealed that in all DWTPs and WTPs, higher numbers of (oo)cysts were found in inland than in coastal areas (Table 2). In fact, the mean concentration of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts in the effluents of WTPs collected in inland area was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in samples collected from coastal area. Moreover, no empty (oo)cysts, i.e. without internal characteristics (ghosts) were found in any of the positive water samples. Moreover, most *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts were PI-negative and thus impermeable and viable at assay (90.0% and 95.0% respectively).

### 3.3. Molecular identification of parasites in animal and water samples

Samples that contained relatively high concentrations of nucleated (oo)cysts detected by IMS-IFA were selected for processing. Unfortunately, *Cryptosporidium* SSU rRNA and *G. duodenalis*  $\beta$ -giardin genes PCR did not yield positive results for wild animals and DWTPs but PCR and sequencing of the DNA from (oo)cysts from domestic animals and wastewater samples (raw or treated) were carried out successfully (Table 3).

In the coastal area, PCR amplification of the 18S SSU rRNA gene from *Cryptosporidium* spp. showed that *C. parvum* in neonatal ruminants (calves and lambs) was detected and *C. parvum* and *C. andersoni* were identified in heifers (Table 3A). Moreover, four of the eight raw or treated wastewater samples (50.0%) contained this protozoon. *Cryptosporidium parvum* and *C. hominis* were identified most frequently, but *C. andersoni* was not detected (Table 3A). *Cryptosporidium hominis* predominated in the treated wastewater. For *G. duodenalis* genotypes, assemblage A-I was detected in neonatal calves and heifers while assemblage E was detected in heifers, cows and sheep (Table 3A). On the other hand, 3/12 (25.0%) of the raw water samples, and 5/12 (41.6%) of

the twelve treated wastewater samples were PCR positive for *G. duodenalis* (Table 3A). Sequence analysis revealed the presence of the major assemblage of *G. duodenalis*. Assemblage A was found in all samples. Within assemblage A, one sample belonged to subtype A-I, three belonged to A-II and four samples yielded mixed sequencing signals indicating the presence of mixed *G. duodenalis* genotypes, specifically, assemblages A-I + E (Table 3A).

In the inland area, *C. parvum* was detected in all domestic ruminants and *C. andersoni* was identified in heifers and cows (Table 3B). The results obtained by the sequencing and/or PCR-restriction fragment length polymorphism of the (oo)cyst samples from influent and effluent of WTPs were different from those obtained for the coastal area. Thus, *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* genotypes were detected in 6 (75.0%) and 7 (58.3%) raw wastewater samples respectively, while these enteropathogens were identified in 5 (41.6%) and 7 (58.3%) of the treated wastewater samples respectively (Table 3B). Only *C. parvum* and *C. andersoni* were identified. *Giardia duodenalis* assemblage A-I was detected in cattle while assemblage A-II was found in wastewaters (Table 3B). Moreover, assemblage B was found in lambs and sheep; nevertheless, assemblage E was detected in all domestic animals (Table 3B). The presence of mixed *G. duodenalis* genotypes was detected in one sample (assemblages A-I + A-II) and in two samples of both raw and treated wastewater (assemblages A-I + E) (Table 3B).

## 4. Discussion

A comprehensive epidemiological study of cryptosporidiosis and giardiasis was carried out in two very different areas (coastal and inland). The results obtained indicated that the presence of these parasites was greater in the inland, intensively farmed area. Moreover, in this area there are only three large hydrographical basins, which include several recreational areas, river beaches and pumping areas for drinking water treatment plants (DWTPs). The possibility of acquiring human and animal cryptosporidiosis and giardiasis is high considering that all of the final effluents from the WTPs are discharged into the three hydrographical basins (range = 1–10,000 (oo)cysts per litre), the livestock in the area usually graze throughout the year shedding *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* to pasture (range = 10–15,412 (oo)cysts per gramme of faeces), farmers spread agricultural slurry on pasture land, and that there is further contamination by deer and wild boars (range = 5–200 (oo)cysts per gramme of faeces). In fact, the infective dose (ID50) in humans can be as low as 9 *C. parvum* oocysts, although highly different ID50 values have been found for different isolates (Fayer et al., 2000a). During recent years, several waterborne outbreaks by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* have been documented

**Table 3**Distribution of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* species and genotypes in domestic animals and wastewater treatment plants in coastal (A) and inland (B) areas.

Sample	Neonatal calves	Heifers	Cows	Neonatal lambs	Sheep	Raw wastewater	Treated
<b>A) Coastal area</b>							
<i>Cryptosporidium</i> spp.							
No. of samples tested	7	11	7	8	6	8	8
PCR positive	6	8	2	8	3	5	6
Sequence	6	4	–	6	–	4	4
<i>C. andersoni</i>	–	3	–	–	–	–	–
<i>C. hominis</i>	–	–	–	–	–	2	3
<i>C. parvum</i>	6	1	–	6	–	2	1
<i>G. duodenalis</i>							
No. of samples tested	4	26	19	10	29	12	12
PCR positive	4	17	8	6	10	5	6
Sequence	2	5	5	–	6	3	5
Assemblage A-I	2	1	–	–	–	–	1
Assemblage A-II	–	–	–	–	–	1	2
Assemblage B	–	–	–	–	2	–	–
Assemblage E	–	4	5	–	4	–	–
Assemblage A-I + E	–	–	–	–	–	2	2
<b>B) Inland area</b>							
<i>Cryptosporidium</i> spp.							
No. of samples tested	23	27	22	18	10	8	8
PCR positive	20	22	15	14	9	7	6
Sequence	20	18	10	12	9	6	5
<i>C. andersoni</i>	–	7	7	–	–	2	3
<i>C. hominis</i>	–	–	–	–	–	–	–
<i>C. parvum</i>	20	11	3	12	9	4	2
<i>G. duodenalis</i>							
No. of samples tested	14	56	73	20	53	12	12
PCR positive	12	32	22	15	47	8	8
Sequence	10	20	8	9	16	7	7
Assemblage A-I	8	5	2	–	–	–	–
Assemblage A-II	–	–	–	–	–	4	4
Assemblage B	–	–	–	4	5	–	–
Assemblage E	2	15	6	5	11	–	1
Assemblage A-I + A-II	–	–	–	–	–	1	–
Assemblage A-II + E	–	–	–	–	–	2	2

worldwide (Fayer, 2004; Giangaspero et al., 2007; Reynolds et al., 2008; Mason et al., 2010; Yoder and Beach, 2010). Nevertheless, in Spain very few epidemiological surveys have been carried out to establish the occurrence of these protozoa in drinking water, and no significant waterborne outbreaks of cryptosporidiosis or giardiasis have been reported (Montemayor et al., 2005; Gómez-Couso et al., 2005, 2006; Carmena et al., 2007; Castro-Hermida et al., 2008).

Coastal and inland areas are characterised by a high density of livestock animals, (26,304 and 148,368 respectively). Although there are more farms in inland than in the coast, there was no significant difference in the prevalence of cryptosporidiosis and giardiasis in livestock animals in the different areas. However the difference in infection rates in wild animals was significant. These data demonstrate the importance of livestock as a reservoir of infectious parasites, a potential source of environmental contamination and transmission to wild animals (Fayer et al., 2000b; Castro-Hermida et al., 2006). The age of the animals is one of the most important risk factors associated with cryptosporidiosis and giardiasis, and young animals are more susceptible to infection than adults. Nevertheless, it has been shown that asymptomatic adult domestic ruminants, especially heifers and cows, may act as healthy carriers and may be a source of infection for younger animals (Fayer et al., 2000b; Castro-Hermida et al., 2007a). *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts have been demonstrated in run-off from agricultural areas (Slifko et al., 2000; Fayer, 2004; Smith et al., 2007; Smith and Nichols, 2010), and some outbreaks of cryptosporidiosis and giardiasis in humans have been attributed to contamination of drinking and bathing water with such effluents.

In each selected area, both pathogens were detected in neonatal calves, heifers and cows, although *G. duodenalis* was more prevalent than *Cryptosporidium* spp. in heifers and cows than in calves <1 month. The results are therefore consistent with those of studies in North America and Europe, in which similar levels of infection were observed in dairy and beef cattle (Fayer et al., 2000b; Wade et al., 2000; Trout et al., 2005; Castro-Hermida et al., 2006). As regards *G. duodenalis*, the present results are consistent with those of O'Handley et al. (1999), who observed higher levels of cyst excretion in calves >1 month old. In the present study, *G. duodenalis* was always more prevalent than *Cryptosporidium* spp. in sheep. The mean rate of excretion of *Cryptosporidium* spp. oocysts in neonatal calves and lambs was between 1 and 4 oocysts per microscopic field at 1000× magnification and the mean intensity of infection by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in the adult animals (domestic and wild) was between 2 and 1484 oocysts per gramme and 3 and 15,412 cysts per gramme of faeces respectively; these figures are similar to those reported in previous studies in the same species of animals (O'Handley et al., 1999; Ralston et al., 2003; Castro-Hermida et al., 2005, 2006; Monis et al., 2009; Feng, 2010).

In the coastal area, *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* (oo)cysts were detected in both influent and effluent from DWTPs and the percentage of positive samples was low in comparison with the DWTPs analysed in inland areas. The occurrence reported here for coastal area samples is similar to that reported in different countries (Hashimoto et al., 2001; Karanis et al., 2002, 2006; Mason et al., 2010).

Nevertheless, the high prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts in the inland area may be related to the fact



that livestock farming, especially dairy cattle farming is predominant in this area. The area includes several pastures and cultivated areas that are fertilized throughout the year, as well as areas dedicated to both large and small game hunting. Uncontrolled contamination may therefore occur via animals, especially wild animals, which contribute to contamination of the three hydrographical basins in the area. In fact, the prevalence of both cryptosporidiosis and giardiasis in wild animals in the inland area was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in the coastal area. Wild animals were frequently observed during the study, residing in the natural vegetation buffer zones or directly within agricultural and urban settings.

In the coastal area, twelve small hydrographical basins supply water to drinking water treatment plants (DWTPs), which provide drinking water to more than 213,862 inhabitants in the area (~130 inhabitants/km<sup>2</sup>). In the inland area, three hydrographical basins supply drinking water to more than 110,196 inhabitants (~35 inhabitants/km<sup>2</sup>). In both areas, the DWTPs pumping areas are located in rivers. The numbers of parasites in the river water depend on the size of the community served, as well as the rate of infection within the population (Smith and Rose, 1990). The probability that the population will include an infected individual obviously increases with the number of inhabitants (Smith and Rose, 1990). However, the prevalence of both *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in the influents from DWTPs (river water) in the inland area was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in the samples collected from the coastal area. These results indicate not only that animals (domestic and wildlife) affect contamination of rivers, but that the effluent from WTPs also has an important role in the contamination of hydrographic basins. Furthermore, the existence of only three major basins in the inland area favours concentration of parasites because these rivers transport effluents from the WTPs and the contamination from livestock. It is therefore important that surveillance checks are carried out frequently in such areas. Moreover, the results of the examination of all of the water samples, along with the results obtained in domestic and wild animals confirm that infections by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* are widespread throughout this region of Spain, with giardiasis being more widespread and occurring at greater intensity of infection than cryptosporidiosis. This is consistent with findings reported for other countries (Fayer, 2004; Sunderland et al., 2007).

The understanding of these parasitic diseases can be improved by the increasing use of molecular techniques (Monis et al., 2009; Smith and Nichols, 2010; Xiao, 2010). In the coastal area, *C. parvum* and *C. hominis* were identified most frequently and *C. andersoni* was only detected in heifers. *Cryptosporidium hominis* has been mainly involved in the anthroponotic route of transmission, but was the predominant species in the coastal area, suggesting that most oocysts in the raw water originated from human infections. By contrast, in the inland area, only *C. parvum* and *C. andersoni* were identified. Although *C. andersoni* also presents zoonotic characteristics, it mainly infects the abomasums of juvenile and mature cattle and it is not known to infect animals other than cattle; in the present study it was mainly detected in heifers and cows and the raw wastewater of the WTPs in the inland area where livestock farming predominates and which include several pastures and cultivated areas, thus confirming the importance of cattle in the transmission cryptosporidiosis in rural areas. Testing of *Cryptosporidium* sub-types could provide additional information about the transmission routes and will be carried out in future studies.

For *G. duodenalis* genotypes, respect to the coastal area, assemblage A-I (zoonotic) was detected in neonatal calves and heifers while assemblage E (hoofed livestock) was detected in heifers, cows and sheep. In wastewaters, sequence analysis revealed the presence subtype A-I, A-II and the presence of mixed *G. duodenalis* genotypes, specifically, assemblages A-I + E. In the inland area, *G. duodenalis* assemblage A-I was detected in cattle while assemblage A-II was

found in wastewaters. Moreover, assemblage B (zoonotic) was found in lambs and sheep; nevertheless, assemblage E was detected in all domestic animals. The presence of mixed *G. duodenalis* genotypes was detected in one sample (assemblages A-I + A-II) and in two samples of both raw and treated wastewater (assemblages A-I + E). Then, these results demonstrate a high degree of contamination for *G. duodenalis* and the possibility of transmission of giardiasis via animals and waters in the areas studied.

## 5. Conclusions

The results of the present study demonstrate the importance of monitoring the presence of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in domestic ruminants (independently of the age of the animals) as well as in waterways used by farmers (water channels, animal drinking water and drainage systems, and in water destined for human consumption and for recreational purposes). Monitoring of both parasites is particularly important in inland areas and in stretches of rivers used as sources of drinking water, i.e. where water is pumped to drinking water treatment plants or to water storage deposits. Finally, it is important that health authorities rethink the relevance of levels of contamination by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in surface waters and establish appropriate countermeasures.

## Acknowledgements

We thank the farm owners and personnel involved for their helpful collaboration in the study. The authors are grateful to hunters for permission to collect samples from wild animals. Special thanks are due to staff at the DWTPs and WTPs for providing guidance and technical assistance during collection of water samples. The present study was financially supported by the Xunta de Galicia, through the Consellería de Innovación e Industria (10PXIB503055PR), the Ministerio de Ciencia e Innovación, within the Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias (RTA2010-00003-00-00) and by the European Social Fund.

## References

- Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev 2001;14:447–75.
- Anonymous. Anuario de Estadística Agraria Subsector ganadero. Consellería do Medio Rural Xunta de Galicia; 2004. p. 95–146.
- Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. Mol Biochem Parasitol 2008;160:75–80.
- Cacciò SM, Sprong U. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. Exp Parasitol 2010;124:107–12.
- Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the  $\beta$ -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int J Parasitol 2002;32:1023–30.
- Cacciò SM, Beck R, Lalle M, Marinculic A, Pozio E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. Int J Parasitol 2008;38:1523–31.
- Cacciò SM, Beck R, Almeida A, Bajer A, Pozio E. Identification of *Giardia* species and *Giardia duodenalis* assemblages by sequence analysis of the 58 rDNA gene and internal transcribed spacers. Parasitology 2010;17:1–7.
- Cama VA, Ross JM, Crawford S, Kawai V, Chavez-Valdez R, Vargas D, Vivar A, Ticona E, Navincopa M, Williamson J, Ortega Y, Gilman RH, Bern C, Xiao L. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. J Infect Dis 2007;196:684–91.
- Campbell AT, Robertson LJ, Smith HV. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts, correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. Appl Environ Microbiol 1992;58:3488–93.
- Carmena D, Aguinalde X, Zigorraga C, Fernández-Crespo JC, Ocío JA. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. J Appl Microbiol 2007;102:619–29.
- Castro-Hermida JA, Delafosse A, Pors I, Ares-Mazás E, Chartier C. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. Vet Rec 2005;157:623.
- Castro-Hermida JA, Carro-Corral C, González-Warleta M, Mezo M. Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* spp and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Galicia (NW Spain). J Vet Med B 2006;53:244–6.



- Castro-Hermida JA, Almeida A, González-Warleta M, Correia da Costa JM, Rumbolo-Lorenzo C, Mezo M. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitol Res* 2007a;101:1443–8.
- Castro-Hermida JA, González-Warleta M, Mezo M. Natural infection by *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in sheep and goats in Galicia (NW Spain). *Small Rumin Res* 2007b;72:96–100.
- Castro-Hermida JA, García-Preseido I, Almeida A, González-Warleta M, da Costa JM, Correia, Mezo M. Presence of *Cryptosporidium* spp and *Giardia duodenalis* through drinking water. *Sci Total Environ* 2008;405:45–53.
- Castro-Hermida JA, García-Preseido I, Almeida A, González-Warleta M, da Costa JM, Correia, Mezo M. Detection of *Cryptosporidium* spp and *Giardia duodenalis* in surface water: a health risk for human and animals. *Water Res* 2009;43:4133–42.
- Chalmers RM, Robinson G, Elwin K, Hadfield SJ, Thomas E, Walkins J, Casemore D, Kay D. Detection of *Cryptosporidium* species and sources of contamination with *Cryptosporidium hominis* during a waterborne outbreak in North West Wales. *J Water Health* 2010;8:311–25.
- Council Directive 92/43/EC. Council of the European Communities Directive on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. *Off J Eur Union* 1992; L206:0007–50.
- Cummins E, Kennedy R, Cormican M. Quantitative risk assessment of *Cryptosporidium* in tap water in Ireland. *Sci Total Environ* 2010;408:740–53.
- Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol* 2004;126:37–56.
- Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol* 2010;124:90–7.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission detection and identification. *Int J Parasitol* 2000a;30:1305–22.
- Fayer R, Trout JM, Graczyk TD, Lewis EJ. Prevalence of *Cryptosporidium* *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. *Vet Parasitol* 2000b;93:103–12.
- Feng Y. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Exp Parasitol* 2010;124:128–37.
- Geurden T, Geldhof P, Levecke B, Martens C, Berkvens D, Casaert S, Vercruysse J, Claerebout E. Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves. *Int J Parasitol* 2008;38:259–64.
- Giangaspero A, Berrilli F, Brandonisio O. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. *Parasitol Res* 2007;101:1169–82.
- Gómez-Couso H, Méndez-Hermida F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazás E. *Giardia* in shellfish-farming areas: detection in mussels river water and waste waters. *Vet Parasitol* 2005;133:13–8.
- Gómez-Couso H, Méndez-Hermida F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazás E. *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. *J Food Prot* 2006;69:185–90.
- Graczyk TK, Evans BM, Shiff CJ, Karremann HJ, Patz JA. Environmental and geographical factors contributing to watershed contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Environ Res* 2000;82:263–71.
- Graczyk TK, Kacprzak M, Neczaj E, Tamang L, Graczyk H, Lucy FE, Girouard AS. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in sewage sludge and solid waste landfill leachate and quantitative comparative analysis of sanitization treatments on pathogen inactivation. *Environ Res* 2008;106:27–33.
- Graczyk TK, Sunderland D, Awantang GN, Mashinski Y, Lucy FE, Graczyk Z, Chomicz L, Breyse PN. Relationships among bather density levels of human waterborne pathogens and fecal coliform counts in marine recreational beach water. *Parasitol Res* 2010;106:1103–8.
- Hashimoto A, Hirata T, Kunikane S. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in a conventional water purification plant. *Water Sci Technol* 2001;43:89–92.
- Heine J. Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien in Kot. *Zentralbl Veterinärmed B* 1982;29:324–7.
- Karanis P, Papadopolou C, Kimua A, Economou E, Kourenti C, Sakkas H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural drinking and recreational water of northwestern Greece. *Acta Hydrochim Hydrobiol* 2002;30:49–58.
- Karanis P, Sotiriadou I, Kartashev V, Kourenti C, Tsvetkova N, Stojanova K. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environ Res* 2006;102:260–71.
- Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol* 2010;40:1063–74.
- Lefay D, Naciri M, Poirier P, Chermette R. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. *Vet Parasitol* 2000;89:1–9.
- Mason BW, Chalmers RM, Carnicer-Pont D, Casemore DP. A *Cryptosporidium hominis* outbreak in North-West Wales associated with low oocyst counts in treated drinking water. *J Water Health* 2010;8:299–10.
- McCuin RM, Clancy JL. Modifications to United States Environmental Protection Agency Methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:267–74.
- Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* 2009;25:93–100.
- Montemayor M, Valero F, Cofre J, Lucena F. Occurrence of *Cryptosporidium* spp oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. *J Appl Microbiol* 2005;99:1455–62.
- Morrison LJ, Mallon ME, Smith HV, MacLeod A, Xiao L, Tait A. The population structure of the *Cryptosporidium parvum* population in Scotland: a complex picture. *Infect Genet Evol* 2008;8:121–9.
- O'Handley RM, Cockwill C, McAllister TA, Jelinski M, Morck DW, Olson ME. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhoea. *J Am Vet Med Assoc* 1999;214:391–6.
- Ralston BJ, McAllister TA, Olson ME. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. *Vet Parasitol* 2003;114:113–22.
- Reynolds KA, Mena KD, Gerba CP. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev Environ Contam Toxicol* 2008;192:117–58.
- Rose JB, Landeen LK, Riley KR, Gerba CP. Evaluation of immunofluorescence techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 1989;55:3189–96.
- Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol* 2000;30:1379–93.
- Smith HV, Nichols RAB. *Cryptosporidium*: detection in water and food. *Exp Parasitol* 2010;124:61–79.
- Smith HV, Rose JB. Waterborne cryptosporidiosis. *Parasitol Today* 1990;6:8–12.
- Smith HV, Caccio SM, Cook N, Nichols RAB, Tait A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet Parasitol* 2007;149:29–40.
- Sunderland D, Graczyk TK, Tamang L, Breyse PN. Impact of bathers on levels *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts in recreational beach waters. *Water Res* 2007;41:3483–9.
- Thompson RCA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 2000;30:1259–67.
- Trout JM, Santín M, Greiner E, Fayer R. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in post-weaned dairy calves. *Vet Parasitol* 2005;130:177–83.
- US Environmental Protection Agency. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. EPA 821-R-01-025 Office of Ground Water and Drinking Water Technical Support Center. Washington DC: US Environmental Protection Agency; 2001.
- Wade SE, Mohammed HO, Schaaf SL. Prevalence of *Giardia* sp *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*) in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. *Vet Parasitol* 2000;93:1–11.
- Wicki M, Svoboda P, Tanner M. Occurrence of *Giardia lamblia* in recreational streams in Basel-Landschaft Switzerland. *Environ Res* 2009;109:524–7.
- Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol* 2010;124:80–9.
- Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, Thompson RCA, Fayer R, Lal A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3386–91.
- Yoder J, Beach M. *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. *Exp Parasitol* 2010;124:31–9.



**Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Galicia (NW, Spain).**

Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; González-Warleta, M.; Mezo, M.

***Veterinary Parasitology*, 179: 216-219. 2011.**



Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la epidemiología de la cryptosporidiosis y la giardiosis en Galicia, se llevó a cabo un estudio *ad hoc* en muestras fecales de 224 corzos (*Capreolus capreolus*) y 381 jabalíes (*Sus scrofa*) abatidos durante la temporada de caza 2008-2009. El análisis de una sola muestra de cada uno de los corzos reveló que la prevalencia de la cryptosporidiosis y de la giardiosis fue de 1,3% y 5,3%, respectivamente. En estos animales silvestres, se comprobó que la prevalencia de la infección por *G. duodenalis* fue significativamente mayor ( $P<0,05$ ) en las hembras juveniles que en las adultas. En los jabalíes, la prevalencia de la cryptosporidiosis y de la giardiosis fue de 7,6% y 1,3%, respectivamente. La prevalencia de la infección por *Cryptosporidium* spp. fue significativamente mayor ( $P<0,05$ ) en los jabalíes machos juveniles que en los machos adultos. En ambos grupos de animales silvestres, el número de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. por gramo de heces osciló entre 5-200 y el número de quistes de *G. duodenalis* por gramo de heces fluctuó entre 5-47.





Contents lists available at ScienceDirect

## Veterinary Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)

## Short Communication

Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Galicia (NW, Spain)

José Antonio Castro-Hermida\*, Ignacio García-Presedo, Marta González-Warleta, Mercedes Mezo

Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Instituto Galego de Calidade Alimentaria-Xunta de Galicia, Carretera AC-542 de Betanzos a Mesón do Vento, Km 7,5, CP 15318. Abegondo (A Coruña), España

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 September 2010

Received in revised form 18 February 2011

Accepted 28 February 2011

## Keywords:

*Cryptosporidium**Giardia*

Wildlife

*Capreolus capreolus**Sus scrofa*

## ABSTRACT

Faecal samples from 224 roe deer (*Capreolus capreolus*) and 381 wild boars (*Sus scrofa*) shot during the 2008–2009 hunting season (August–January) in Galicia (NW Spain) were examined to determine the presence and intensity of infection by *Cryptosporidium* and *Giardia*. Analysis of a single sample from each of the roe deer revealed that the prevalence of cryptosporidiosis and giardiasis was 1.3% and 5.3% respectively. The prevalence of *Giardia* infection was significantly higher in juvenile female roe deer than in adult females, but no other significant differences were found in relation to age and sex. In wild boars, the prevalence of cryptosporidiosis and giardiasis was 7.6% and 1.3% respectively. The prevalence of *Cryptosporidium* infection was significantly higher in juvenile male wild boars than in adult males, but no other significant differences were found in relation to age or sex. In both groups of wild animals, the number of *Cryptosporidium* oocysts per gram of faeces (OPG) ranged from 5 to 200 and the number of *Giardia* cysts per gram of faeces (CPG) was between 5 and 47; there were no significant differences between the two groups with respect to number of infections. This is the first large study of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer and wild boars in hunting areas in Spain and the results demonstrate a low, but widespread prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in these animals.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Cryptosporidium* and *Giardia* are commonly identified enteric parasites of humans and domestic animals, and are being increasingly recognised as parasites of a diverse range of wildlife species (Fayer, 2004; Castro-Hermida et al., 2005, 2006; Van der Giessen et al., 2006; Lalle et al., 2007; Beck et al., 2010, 2011; Feng, 2010). Studies of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wildlife continue to provide important insights into the taxonomy, host range and zoonotic potential of these enteropathogens (Appelbee et al., 2005; Bednarska et al., 2007; Hamnes et al., 2007; Lim et al., 2009; Thompson et al., 2009, 2010). Specifically,

roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boars (*Sus scrofa*) may act as reservoirs of *Cryptosporidium* and *Giardia* for domestic animals and humans, and as a potential source of contamination of water supplies (Atwill et al., 1997; Hamnes et al., 2006; Paziewska et al., 2007; Feng, 2010).

In Galicia (NW, Spain) roe deer and wild boars are the principal wild ungulate in terms of abundance and distribution, and their population has continuously increased over the past decades (Schmalenberger et al., 2004; Centenera, 2005). To the best of our knowledge no studies on the prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer and wild boars have been reported in Spain. Moreover, in this region extensive farming is frequent, and therefore cattle and sheep often share pastures with wild animals which could represent a potential reservoir for these protozoa. Thus, the aim of the present study was to acquire knowledge about the prevalence and intensity of infection by

\* Corresponding author. Tel.: +34 981 647 902x248;

fax: +34 981 673 656.

E-mail address: jose.antonio.castro.hermida@xunta.es (J.A. Castro-Hermida).

**Table 1**Prevalence and intensity of infection by *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer (*Capreolus capreolus*) in relation to age group and sex.

Age group <sup>a</sup>	Sex	Number <sup>b</sup>	<i>Cryptosporidium</i> positive (%)	Min–Max (OPG) <sup>c</sup>	<i>Giardia</i> positive (%)	Min–Max (CPG) <sup>c</sup>
Juvenile		56	2 (3.5)	7–200	6 (10.7)	5–47
Adult		140	1 (0.7)	5	4 (2.8)	5–20
Unknown		28	0 (0.0)	0	2 (7.1)	5–35
Total		224	3 (1.3)	5–200	12 (5.3)	5–47
	Male	153	2 (1.3)	5–200	6 (3.9)	5–35
	Female	53	0 (0.0)	0	5 (9.4)	6–47
	Unknown	18	1 (5.5)	7	1 (5.5)	5
Samples from roe deer of known age and sex						
Juvenile	Male	35	1 (2.8)	200	2 (5.7)	5–10
	Female	11	0 (0.0)	0	4 (36.3) <sup>d</sup>	6–47
	Total	46	1 (2.1)	200	6 (13.0)	5–47
Adult	Male	105	1 (0.9)	5	3 (2.8)	5–20
	Female	35	0 (0.0)	0	1 (2.8) <sup>d</sup>	10
	Total	140	1 (0.7)	5	4 (2.8)	5–20

<sup>a</sup> Age groups: juvenile ≤ 1 year of age; adult > 1 year of age.<sup>b</sup> Number of samples examined in this category.<sup>c</sup> OPG, number of oocysts per gram of faeces; CPG, number of cysts per gram of faeces.<sup>d</sup> Significant difference in prevalence between the two groups ( $p < 0.05$ ).

*Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer (*C. capreolus*) and wild boars (*S. scrofa*) in this region of Spain.

The present study was carried out in hunting areas in Galicia, region located in Northwestern Spain covering an area of 29,574 km<sup>2</sup> (latitude 42°23'60N, longitude 7°4'W). The terrain is made up of several low mountain ranges crossed by many small rivers. Galicia is the Spanish region with the highest density of roe deer (*C. capreolus*) and wild boars (*S. scrofa*), although territorial differences are considerable. Roe deer and wild boar populations are more abundant in eastern mountainous areas, and their density decreased to west (Schmalenberger et al., 2004; Centenera, 2005). An ad hoc sampling was carried out on 224 roe deer and 381 wild boars shot in different game preserves in Galicia during two consecutive Official hunting seasons (August–January 2008 and 2009). The faecal samples were examined for the presence and intensity of infection by *Cryptosporidium* and *Giardia*. Individual faecal samples were taken directly from the rectum of each animal, with the aid of plastic gloves during the evisceration. Samples were recovered by authors or hunters from differ-

ent hunting districts. An index card was completed for each wild animal, with the following data: sampling date, origin, species, age group and sex. The samples were transported to the laboratory in a cool box and processed within 24 h of collection. Unfortunately, it was not always possible to complete all card details; so, age group (juvenile: ≤ 1 year of age; adult: > 1 year of age) was known for 196 of the roe deer and 338 of the wild boars, while the sex of 206 roe deer and 345 wild boars was known (Tables 1 and 2).

Identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in faecal samples from roe deer and wild boars was carried out by a direct immunofluorescence technique with monoclonal antibodies (IFAT). Briefly, 2 g of faeces were diluted in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, and filtered through a sieve (mesh size 45 µm) into conical centrifuge tubes. Diethyl ether was then added at a proportion of 2:1; the tubes were shaken vigorously and centrifuged at 1000 × g for 5 min at 4 °C, and the top three layers decanted off. The sediment was removed and washed in PBS by centrifuging at 1000 × g for 5 min at 4 °C. The supernatant was decanted and pellet resuspended in PBS to a volume of 1 ml.

**Table 2**Prevalence and intensity of infection by *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild boars (*Sus scrofa*) in relation to age group and sex.

Age group <sup>a</sup>	Sex	Number <sup>b</sup>	<i>Cryptosporidium</i> positive (%)	Min–Max (OPG) <sup>c</sup>	<i>Giardia</i> positive (%)	Min–Max (CPG) <sup>c</sup>
Juvenile		155	22 (14.1)	5–133	2 (1.3)	10
Adult		183	6 (3.2)	5–20	3 (1.6)	5–10
Unknown		43	1 (2.3)	40	0 (0.0)	0
Total		381	29 (7.6)	5–133	5 (1.3)	5–10
	Male	191	14 (7.3)	5–125	2 (1.0)	5–10
	Female	154	11 (7.1)	5–133	3 (5.5)	5–10
	Unknown	36	4 (11.1)	5–25	0 (0.0)	0
Samples from wild boars of known age and sex						
Juvenile	Male	65	12 (18.5) <sup>d</sup>	5–125	1 (1.5)	10
	Female	57	6 (10.5)	5–133	1 (1.7)	10
	Total	122	18 (14.7)	5–133	2 (1.6)	10
Adult	Male	100	2 (2.0) <sup>d</sup>	5–13	1 (1.0)	5
	Female	82	4 (4.8)	5–20	2 (2.4)	5–10
	Total	182	6 (3.3)	5–20	3 (1.6)	5–10

<sup>a</sup> Age groups: juvenile ≤ 1 year of age; adult > 1 year of age.<sup>b</sup> Number of samples examined in this category.<sup>c</sup> OPG, number of oocysts per gram of faeces; CPG, number of cysts per gram of faeces.<sup>d</sup> Significant difference in prevalence between the two groups ( $p < 0.05$ ).



For each sample, 100 µl were air dried to microscope slides, acetone fixed and processed with a commercial kit (Aqua-Glo G/C Direct, FL, Comprehensive Kit. Waterborne, Inc., New Orleans, USA) containing fluorescein isothiocyanate-conjugated monoclonal antibodies. The entire volume of sample was observed by fluorescence microscopy at 400× magnification. The results were expressed as number of (oo)cysts per gram of faeces (Castro-Hermida et al., 2007). This procedure has a theoretical sensitivity of approximately 40 oocysts/cysts per gram of faeces.

The prevalence and intensity of infection determined in the faecal samples were compared by a test of comparison of proportions and the Kruskal–Wallis test (non-parametric ANOVA). Fishers' Exact test and  $\chi^2$ -tests were used to analyze 2 × 2 contingency tables of occurrence in wild animals by sex and age. Parasitological terms are used following the recommendations of the ad hoc committee of the American Society of Parasitologists (Margolis et al., 1982). Analyses were carried out with GraphPad InStat® for Windows, version 3.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

*Cryptosporidium* and *Giardia* have previously been reported from a number of wild animal species (Hamnes et al., 2006, 2007; Lalle et al., 2007; Paziewska et al., 2007; Beck et al., 2010, 2011; Feng, 2010). However, according to the available literature, this is the first extensive, quantitative investigation of the shedding of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in faeces of juvenile and adult roe deer and wild boars in hunting areas in Spain.

Analysis of a single sample from each of the roe deer revealed that the prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* was 1.3% and 5.3% respectively (Table 1). A higher prevalence of *Giardia* than *Cryptosporidium* was also observed by Hamnes et al. (2006), whereas Paziewska et al. (2007) found that *Cryptosporidium* was more prevalent than *Giardia*. Moreover, Beck et al. (2010) in a large survey of Croatian wild mammals detected that the prevalence of *Giardia* was 24.0% in roe deer. Our results may be due to *Giardia* infections usually last longer than *Cryptosporidium* infections and are therefore easier to detect in a single sample. Another reason for the higher prevalence of *Giardia* may be that all animals in this survey were more than 5 months old and it is known that *Cryptosporidium* (in domestic species) is most prevalent among neonatal animals (<1 month), while *Giardia* is more frequently found in older animals (Castro-Hermida et al., 2006, 2007). The distribution of positive samples by age and sex is shown in Table 1. The prevalence of *Giardia* infection was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in juvenile female roe deer than in adult females, but no other significant differences were observed in relation to age or sex (Table 1).

In wild boars, the prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* was 7.6% and 1.3% respectively (Table 2). Scarce information is available on the prevalence of both parasites in these animals. In a study carried out by Atwill et al. (1997), 5.4% and 7.6% of the feral pigs sampled during the summer were shedding *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts, respectively. Recently, Beck et al. (2010) observed a similar prevalence of *Giardia* (1.7%) in wild boars in Croatia. Our results may suggest that wild boars are more

susceptible than roe deer to *Cryptosporidium*, although the differences in the prevalence of both parasites in roe deer and wild boars may be related to differences in habitat and diet. Our results also indicated that the prevalence of *Cryptosporidium* infection was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in juvenile male wild boars than in adult males, but no other significant differences were observed in relation to age or sex (Table 2).

In our study, the mean intensity of infection by *Cryptosporidium* and *Giardia* in the wild animals was between 5 and 200 oocysts per gram and 5 and 47 cysts per gram of faeces, respectively, figures that are similar to those reported in previous studies carried out in domestic and wild animals (Castro-Hermida et al., 2005, 2006; Monis et al., 2009; Feng, 2010). We observed that all infected wild animals were located in environments where domestic hosts, including humans, encroach into wildlife habitats or vice versa (wild boars). However, the rivers in the hunting areas are surrounded by agricultural sites and, although the hunting areas sampled are officially closed to the public, they are frequented by campers, and incursions by domestic or feral cats and dogs are presumably common. Consequently, humans and domestic animals may be the source of environmental contamination from which wildlife contract the infection.

This is the first large study of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer and wild boars in hunting areas in Spain and the results demonstrate a low, but widespread prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in these animals.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to hunters for giving permission to collect samples from the animals. The study was financially supported by the Government of Galicia, through the *Consellería de Innovación e Industria* (10PXIB503055PR) and Government of Spain, through the *Ministerio de Ciencia e Innovación*, within the *Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias* (RTA2010-00003-00-00) and by the European Social Fund.

#### References

- Appelbee, A.J., Thompson, R.C.A., Olson, M.E., 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife—current status and future needs. *Trends Parasitol.* 21, 370–376.
- Atwill, E.R., Sweitzer, R.A., Pereira, M.G.C., Gardner, I.A., Van Vuren, D., Boyce, W.M., 1997. Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. *App. Environ. Microbiol.* 63, 3946–3949.
- Bednarska, M., Bajer, A., Sinski, E., Girouard, A.S., Tamang, L., Graczyk, T.K., 2007. Fluorescent in situ hybridization as a tool to retrospectively identify *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in samples from terrestrial mammalian wildlife. *Parasitol. Res.* 100, 455–460.
- Beck, R., Sprong, H., Lucinger, S., Pozio, E., Cacciò, 2010. A large survey of Croatian wild mammals for *Giardia duodenalis* reveals a low prevalence and limited zoonotic potential. *Vector Borne Zoonotic Dis.* doi:10.1089/vbz.2010.0113.
- Beck, R., Sprong, H., Bata, I., Lucinger, S., Pozio, E., Cacciò, 2011. Prevalence and molecular typing of *Giardia* spp. in captive mammals at the zoo of Zagreb, Croat. *Vet. Parasitol.* 175, 40–46.
- Castro-Hermida, J.A., Carro-Corral, C., González-Warleta, M., Mezo, M., 2006. Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *J. Vet. Med. B* 53, 244–246.

- Castro-Hermida, J.A., Delafosse, A., Pors, I., Ares-Mazás, E., Chartier, C., 2005. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. *Vet. Rec.* 157, 623.
- Castro-Hermida, J.A., González-Warleta, M., Mezo, M., 2007. Natural infection by *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in sheep and goats in Galicia (NW Spain). *Small Rumin. Res.* 72, 96–100.
- Centenera, R., 2005. El corzo. Acercamiento a una realidad. Expansión, caza y gestión. Ed. La Tréberie, p. 192.
- Fayer, R., 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.* 126, 37–56.
- Feng, Y., 2010. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Exp. Parasitol.* 124, 128–137.
- Hamnes, I.S., Gjerde, B., Forberg, T., Robertson, L., 2007. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Vet. Parasitol.* 143, 347–353.
- Hamnes, I.S., Gjerde, B., Robertson, L., Vikoren, T., Handeland, K., 2006. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in free-ranging wild cervids in Norway. *Vet. Parasitol.* 141, 30–41.
- Lalle, M., Frangipane di Regalbano, A., Poppi, L., Nobili, G., Tonanzi, D., Pozio, E., Cacciò, S.M., 2007. A novel *Giardia duodenalis* assemblage A subtype in fallow deer. *J. Parasitol.* 93, 426–428.
- Lim, Y.A., Lai, M., Mahdy, M.A.K., Naim, H.R.M., Smith, H.V., 2009. Molecular detection of *Giardia* contamination in water bodies in a zoo. *Environ. Res.* 109, 857–859.
- Margolis, L., Esch, G.W., Holmes, J.C., Kuris, M., Schad, G.A., 1982. The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). *J. Parasitol.* 68, 131–133.
- Monis, P.T., Caccio, S.M., Thompson, R.C., 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.* 25, 93–100.
- Paziewska, A., Bednarska, M., Nieweglowski, H., Karbowiak, G., Bajer, A., 2007. Distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in selected species of protected and game mammals from North-Eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 14, 265–270.
- Schmalenberger, H., Carro Mariño, F., Rodríguez Larrinaga, A., 2004. Métodos disuasorios y de minimización de daños de la fauna cinegética en Galicia. La prevención en los cultivos agrícolas. In: Schmalenberger, H., Matos Sobrino, J.M., Huertas Cifuentes, D., Bernard Danzberger, J. (Eds.), Jornadas sobre prevención de daños producidos por especies cinegéticas. Consellería do Medio Ambiente, Xunta de Galicia, Spain, pp. 19–43.
- Thompson, R.C.A., Kutz, S.J., Smith, A., 2009. Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6, 678–693.
- Thompson, R.C.A., Smith, A., Lymbery, A.J., Averis, S., Morris, K.D., Wayne, K.D., 2010. *Giardia* in Western Australian wildlife. *Vet. Parasitol.* 170, 207–211.
- Van der Giessen, J.W., de Vries, A., Roos, M., Wielinga, P., Kortbeek, L.M., Mank, T.G., 2006. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: a phylogenetic analysis of human and animals isolates. *Int. J. Parasitol.* 36, 849–858.

**Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals.**

Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, L.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M.

***Water Research*, 43: 4133-4142. 2009.**



El objetivo del estudio fue determinar el efecto de la actividad ganadera sobre la contaminación del agua en una cuenca hidrográfica por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*. Las muestras de agua (50 l) fueron tomadas en 22 puntos de la cuenca principal (incluyendo cinco áreas recreativas), en el nacimiento y desembocadura de los tres afluentes más importantes y en la desembocadura de un afluente secundario. Además, se llevaron a cabo análisis fecales del ganado bovino de 18 granjas situadas en el sistema de explotación hidrográfica. El estudio se llevó a cabo en primavera, verano, otoño e invierno de 2007. Se analizaron un total de 116 muestras de agua, 139 terneros recién nacidos, 480 novillas y 697 vacas. En las muestras hídricas, se llevaron a cabo estudios de biología molecular para identificar las especies de *Cryptosporidium* y los genotipos de *G. duodenalis*. Tanto en las muestras hídricas como fecales se observaron mayores concentraciones de formas parasitarias en primavera y verano que en otoño e invierno. En la primavera, se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 33 (9,4%) vacas pertenecientes a 13 (72,2%) rebaños, y se identificaron quistes de *G. duodenalis* en 56 (16,0%) vacas de 15 (83,3%) explotaciones. En esta época del año, se observaron formas infectantes de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en 26 (89,6%) y 27 (93,1%) muestras de agua respectivamente. Las concentraciones medias de parásitos oscilaron entre 2-1.200 ooquistes de *Cryptosporidium* spp. por litro y entre 2-400 quistes de *G. duodenalis* por litro. En el agua se detectó *C. andersoni*, *C. hominis*, *C. parvum* y los genotipos AI, A-II y E de *G. duodenalis*.



Available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.elsevier.com/locate/watres](http://www.elsevier.com/locate/watres)

## Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals

José Antonio Castro-Hermida<sup>a,\*</sup>, Ignacio García-Presedo<sup>a</sup>, André Almeida<sup>b</sup>,  
Marta González-Warleta<sup>a</sup>, José Manuel Correia Da Costa<sup>b</sup>, Mercedes Mezo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo-Xunta de Galicia, Carretera AC-542 de Betanzos a Mesón do Vento, Km 7,5, CP 15318 Abegondo (A Coruña), Spain

<sup>b</sup>Centro de Imunología e Biología Parasitaria-INSa, Porto, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 February 2009

Received in revised form

17 April 2009

Accepted 9 June 2009

Published online 16 June 2009

#### Keywords:

*Cryptosporidium* spp.

*Giardia duodenalis*

Cattle farms

Environmental contamination

Water quality

Public health, Spain

### ABSTRACT

The objective of the present study was to determine the degree of contamination by *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in a river basin in a livestock farming area in Galicia (NW, Spain). Water samples (50 l) were collected at 22 points in the main basin (including 5 recreational areas), and at the source and mouth of the 3 most important rivers and at the mouth of a smaller, secondary river. Faecal samples were collected from dairy cattle selected at random from 18 herds farmed in the area. A total of 139 neonatal calves, 480 heifers and 697 cows were sampled. The prevalence, intensity of infection and the risk associated with the spread of infection by both enteropathogens were determined. Water and faecal samples were collected in spring, summer, autumn and winter of 2007. The species and genotypes of these parasites present in the water samples were identified. In both water and faecal samples, more parasitic stages were collected in spring and summer than in autumn and winter. In spring, *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected in 33 (9.4%) cows from 13 (72.2%) herds, and *G. duodenalis* cysts were detected in 56 (16.0%) cows from 15 farms (83.3%); the intensity of infection ranged from 5 to 7895 *G. duodenalis* cysts per gram of faeces. Infective stages of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* were also detected in respectively 26 (89.6%) and 27 (93.1%) water samples, in spring. The mean concentrations of parasites ranged from 2 to 1200 *Cryptosporidium* spp. oocysts per litre and from 2 to 400 *G. duodenalis* cysts per litre. *Cryptosporidium parvum*, *C. andersoni*, *C. hominis* and assemblages A-I, A-II, E of *G. duodenalis* were detected. The presence of both protozoans must be monitored in cattle, in sources of water used for recreational purposes and in artificial waterways used by farmers (water channels, animal drinking water and drainage systems).

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* are common food and waterborne protozoa that affect humans and a wide range of domestic and wild animals (Fayer, 2004). These parasites

are among the major causal agents of diarrhoeal disease in humans and animals worldwide, and can even potentially shorten the life span of immunocompromised hosts (Smith et al., 2007; Reynolds et al., 2008). Transmission is sustained by both a zoonotic and an anthroponotic cycle (Fayer et al., 2000a;

\* Corresponding author. Tel.: +34 981 647 902x248; fax: +34 981 673 656.

E-mail addresses: [jose.antonio.castro.hermida@xunta.es](mailto:jose.antonio.castro.hermida@xunta.es), [castrohermida@hotmail.com](mailto:castrohermida@hotmail.com) (J.A. Castro-Hermida).

0043-1354/\$ – see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2009.06.020



Slifko et al., 2000; Thompson, 2000). Many recent studies have investigated the prevalence of these protozoans in domestic ruminants (Castro-Hermida et al., 2005, 2007a,b; Fayer et al., 2006). Infections by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* have been associated with economic losses, through the occurrence of diarrhoea in productive animals, and also death of animals, especially neonatal domestic ruminants (Fayer et al., 2000a; Adam, 2001). The infected hosts, whether humans or animals, shed very large numbers of transmissive stages -oocysts or cysts- in their faeces, thereby increasing environmental contamination. Moreover, the (oo)cysts are very resistant to harsh environmental conditions and disinfectants (Karanis et al., 2002; WHO, 2002; Centre of Disease Control and Prevention, 2006). *Giardia duodenalis* cysts have been shown to survive in water for up to 2 months at temperatures as low as 8 °C (Meyer and Jarroll, 1980), and *Cryptosporidium* spp. oocysts can survive for up to 1 year at 4 °C in artificial seawater (Tamburrini and Pozio, 1999). The number of parasites required to induce infection is relatively low. In fact, the infectious dose has been estimated to be as low as 10 *Cryptosporidium* spp. oocysts (Fayer et al., 2000a) or 10 *G. duodenalis* cysts (Adam, 2001).

Infected adult animals can act as reservoirs of pathogens, and even though they show no obvious signs of disease or clinical symptoms (Castro-Hermida et al., 2005, 2007a,b), they may ultimately spread the pathogens to human food (Hancock et al., 2001) or directly to humans (Enriquez et al., 2001). There are no requirements for testing surface waters for the presence of these parasites, although analyses of outbreaks have shown that the pathogens can be shed into recreational waters (Karanis et al., 2006; Giangaspero et al., 2007; Sunderland et al., 2007).

The present study was carried out in the Tambre river basin (1530 km<sup>2</sup> in surface; 42°46'–43°10' N, 8°00'–9°03' W). This river basin is one of the most important in this study region (Galicia, NW Spain) and the river Tambre was declared a Site of Community Importance (SCI), by the European Commission Habitats Directive (92/43/EEC) in 2001. Nevertheless, there is a significant level of farming activity in the area, predominantly cattle farming (livestock census: 69,803), the runoff from which may be a potential source of contamination in surface water. Moreover, the river is a source of water destined for human consumption, providing drinking water to approximately 200,000 people. The drinking water sources are generally open to varied recreational uses, including swimming, especially during the spring and summer. The overall aim of the present study was to establish the degree of contamination by *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in this river basin. For this, the prevalence and intensity of infection by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in dairy cattle were determined and the risk associated with the spread of infection by both enteropathogens was estimated. Moreover, the prevalence and concentrations of these parasites were determined at 22 points in the main basin (including 5 recreational areas), and at the source and mouth of the 3 largest rivers and at the mouth of a secondary river. Finally, the species and genotype of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* present in river water samples were identified by means of a molecular assay in order to clarify the identification of host sources of these parasites that contribute to environmental contamination.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Detection and quantification of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* (oo)cysts from faecal samples

Faecal samples were collected, in spring, summer, autumn and winter of 2007, from 139 neonatal calves, 480 heifers and 697 cows from 18 dairy herds in the Tambre river basin. Farms were selected at random and the only possible restriction was whether the farmers consented to the study. The samples were obtained by direct rectal sampling, with sterile plastic gloves or sterile rectal swabs, and the sampling date, origin, age and identification number were recorded for each animal. The samples were transported to the laboratory in a cool box and stored for a maximum of 24 h before analysis.

Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in faecal samples from neonatal calves (<1 month) was carried out by the direct examination method of Heine (1982). The intensity of infection was evaluated semiquantitatively according to the average number of oocysts in 50 randomly selected microscopic fields at 1000× magnification. The categories established were 0: absence of oocysts; 1: ≤1 oocyst per field; 2: 2–5 oocysts per field; 3: 6–10 oocysts per field and 4: >10 oocysts per field. In heifers and cows, *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected by a direct immunofluorescence technique with monoclonal antibodies (IFAT) (Aqua-Glo G/C Direct, FL, Comprehensive Kit. Waterborne, Inc., New Orleans, LA). The same technique was also used for detection of *G. duodenalis* cysts in all animals. Briefly, 2 g of faeces was diluted in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, and filtered through a sieve (mesh size: 45 µm) into conical centrifuge tubes. Diethyl ether was then added at a proportion of 2:1; the tubes were shaken vigorously and centrifuged at 1000 × g for 5 min at 4 °C and the top 3 layers decanted off. The sediment was removed and washed in PBS by centrifuging at 1000 × g for 5 min at 4 °C. Aliquots of the sediment (100 µl) were fixed in acetone on slides at 4 °C for 10 min and processed with a commercial kit, which contains fluorescein isothiocyanate-conjugated monoclonal antibodies. All the sample volume was observed by fluorescence microscopy at 400× magnification. The number of oocysts per gram of faeces and the number of cysts per gram of faeces was calculated as follows: number of oocysts or cysts identified/(volume of sample examined (ml) × weight of faeces (g)). The sensitivity of this technique was 20 (oo)cysts per gram of faeces.

### 2.2. Detection and quantification of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* (oo)cysts from river water samples

Water samples (50 l) were collected at 22 points in the main basin of the river Tambre (including 5 recreational areas) and at the source and mouth of the 3 largest rivers and at the mouth of a secondary river. The 29 sampling points were sampled in the spring, summer, autumn and winter of 2007.

The 116 samples were taken immediately to the laboratory and processed with the Filta-Max Automatic System (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME). Filtration cartridges were set up according to the manufacturer's instructions, and all samples were filtered at recommended flow rates. The filter



elution and final concentration of the sample were determined with the same equipment, and by following the manufacturer's instructions. Briefly, this involved placing a membrane filter (3- $\mu$ m pore size; polysulphone) in the base of the sample concentrator, inserting the filter module into the apparatus, adding 600 ml of phosphate buffered saline (PBS) containing 0.01% Tween 20 (PBST) to the reservoir, and unscrewing the filter housing to allow expansion of the foam pads. The foam pads were washed by pumping the plunger and then transferring the PBST elution volume into the magnetic particle concentrator and filtering the entire volume to approximately 20–25 ml, under vacuum. The process was repeated with a second volume (600 ml) of PBST and the resulting concentrate was pooled with the first concentrate and then filtered under vacuum to produce a final volume of around 20 ml. This was then transferred into a 50-ml centrifuge tube. The filter membrane was transferred to a small sealable plastic bag, and 8–10 ml of PBST was added, the membrane was kneaded manually, and the spent wash volume was pooled with the primary eluate. The membrane washing procedure was repeated twice. The sample was resuspended to 50 ml with PBST and centrifuged at  $1500 \times g$  for 5 min. The supernatant was aspirated to 10 ml, and the resuspended pellet was transferred to a Leighton tube and subjected to Immunomagnetic Separation technology (IMS).

The IMS procedure was performed as described in US EPA method 1623 (USEPA, 2001). Briefly, each 10-ml sample concentrate was added to a Leighton tube containing 1 ml of  $10\times$  SL buffer A and 1 ml of  $10\times$  SL buffer B (Dynabeads<sup>®</sup> GC-Combo, Invitrogen Dynal, A.S., Oslo, Norway). One hundred microlitres of *Cryptosporidium* and *Giardia* IMS beads were added to each tube, and samples were incubated for 1 h at room temperature with constant rotation. The Leighton tubes were then placed in a magnetic particle concentrator and gently rocked for 2 min through an angle of  $90^\circ$ . The supernatant was decanted; the tubes were removed from the magnetic particle concentrator, and 1 ml of  $1\times$  SL buffer A was added to each. The tubes were gently rocked to resuspend the bead-(oo)cyst complexes; the suspension was transferred to 1.5 ml polypropylene tubes, with a Pasteur pipette, and these tubes were placed in a second magnetic particle concentrator and rocked for 1 min. The supernatants were aspirated, the magnet was removed, and 50  $\mu$ l of 0.1 N HCl was added to each sample, which was vortexed for a minimum of 10 s. The samples were allowed to stand for 10 min in an upright position, then vortexed for a further 10 s, and magnets inserted. The tubes were left undisturbed for 2 min. The beads collected at the back of the tube and the acidified suspension was transferred to the wells of a 2-welled slide, each containing 5  $\mu$ l of 1.0 N NaOH.

The samples were dried, fixed in acetone, and 50  $\mu$ l of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-*Cryptosporidium* sp. and anti-*Giardia* sp. MAbs (Aqua-Glo; Waterborne, Inc., New Orleans, LA) were placed in each well. The slides were placed in a humidified chamber, incubated ( $37^\circ\text{C}$  for 45 min), and excess FITC-MAB was aspirated. Any remaining FITC-MAB was removed by adding 50  $\mu$ l of PBS to each well, leaving the slides for 5 min, and aspirating the excess PBS. A 50  $\mu$ l aliquot of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution (0.4  $\mu\text{g/ml}$  in PBS) was placed in each well. The slides were left at room temperature for 15 min, and excess DAPI solution

was removed by washing the slides twice in PBS and once in distilled water. The slides were placed in the dark until dry, then a 10  $\mu$ l aliquot of mounting medium (2% di-zabicyclooctane [DABCO] in 60% glycerol 40% PBS) was placed in each well, and the slides were sealed for subsequent examination under epifluorescence optics, as described in method 1623 (USEPA, 2001). *Cryptosporidium* spp. oocysts were identified on the basis of their size, shape, and the presence of a suture on the oocyst wall, at a magnification of  $400\times$ . *Giardia* spp. cysts were identified by their size, shape and the pattern and intensity of immunofluorescence assay staining (i.e., bright green fluorescence of the cyst wall). Parasites in each slide well were enumerated, and the mean numbers were used to extrapolate to concentrations of parasites per litre of sample. Positive and negative controls were used, as recommended in Method 1623. The mean percentage recoveries, calculated by the method described by McCuin and Clancy (2003), of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts from source water samples by use of the Filt-Max system and IMS, were  $50 \pm 13$  and  $41 \pm 9\%$ , respectively.

### 2.3. DNA extraction, gene amplification and sequencing for river water samples

For selected samples that contained relatively high concentrations of nucleated (oo)cysts, the remaining river water (which had not been examined) was concentrated by centrifugation. The parasites were isolated by IMS (Dynabeads<sup>®</sup> GC-Combo, Invitrogen Dynal, A.S., Oslo, Norway), following the manufacturer's instructions, although the beads were washed several times before the beads and parasites were dissociated, and the isolated parasites were resuspended in Tris-EDTA buffer. DNA was isolated with a QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini kit (QIAGEN GmbH, Germany), according to the manufacturer's instructions.

*Cryptosporidium* species and genotypes were determined by a technique based on PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of the small-subunit (SSU) ribosomal RNA gene (18S SSU rRNA). A 2-step nested PCR protocol was used to amplify an 830 bp fragment of the 18S SSU rRNA gene, with primers 5'-TTCTAGAGCTAATACATGC G-3' and 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAG GA-3' for primary PCR and 5'-GGAAGGGTTGTATTATTAGATAAAG-3' and 5'-AAG GAGTAAGGAACAACCTCC A-3' for secondary PCR (Xiao et al., 1999). The primary PCR mixture contained  $1\times$  PCR buffer, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  (each) deoxynucleoside triphosphate, 100 nM (each) primer, 2 units of Taq polymerase (New England BioLabs), and 10  $\mu$ l of purified DNA in a final volume of 50  $\mu$ l. Each of 45 cycles consisted of  $94^\circ\text{C}$  for 40 s,  $55^\circ\text{C}$  for 40 s, and  $72^\circ\text{C}$  for 1 min 30 s after an initial hot start at  $94^\circ\text{C}$  for 4 min and ending with  $72^\circ\text{C}$  for 7 min. A secondary PCR product was then amplified from 5  $\mu$ l of the primary PCR. The secondary PCR mixture was identical except that the  $\text{MgCl}_2$  concentration was 3 mM. Each of the 45 cycles consisted of  $94^\circ\text{C}$  for 40 s,  $55^\circ\text{C}$  for 40 s, and  $72^\circ\text{C}$  for 1 min after an initial hot start at  $94^\circ\text{C}$  for 4 min and ending with  $72^\circ\text{C}$  for 7 min.

For molecular typing of *G. duodenalis*, a semi-nested PCR and partial sequencing of the  $\beta$ -giardin locus were performed (Cacciò et al., 2002). In the primary reaction, a 753 bp fragment was amplified with the forward primer G7 5'-AAGCCGAC-GACCTACCCGCGAGTGC-3', 3' and the reverse primer G759

5'-GAGGCCGCGCTGGATCTTCGAGACGAC-3'. In the sequential semi-nested PCR reaction, a 384 bp fragment was amplified with the forward inner primer G376 5'-CATAACGACGC CATCGCGGCTCTCAGGAA-3' and the reverse primer G759, as previously described by Cacciò et al. (2002). The PCR mix contained 1× PCR buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM (each) deoxy-nucleoside triphosphate, 200 nM (each) primer, 2.5 units of Taq polymerase (New England BioLabs), and 5 μl of purified DNA as template for primary steps and 2.5 μl of primary PCR product for secondary steps, in a final volume of 50 μl. The PCR was performed as follows: an initial denaturation step of 94 °C for 5 min, 40 cycles of 30 s at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 60 s and a final extension cycle of 7 min at 72 °C.

In all cases, for each reaction, a negative (water) and a positive control were added. The PCR products were submitted to 1.2% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and the gel image recorded under UV light. Gel images were captured with a gel documentation system (Gel Doc XR system, BioRad).

Following successful PCR, the products were purified (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare Europe GmbH, Germany) and sequenced on both strands (MWG Biotech, Germany). Chromatograms and sequences were examined with Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) and BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>). Sequence searches were conducted with BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

#### 2.4. Statistics

The prevalence and intensity of infection determined in the faecal samples were compared by a test of comparison of proportions and the Kruskal–Wallis test (non-parametric ANOVA). It was not possible to establish the intensity of infection by *Cryptosporidium* spp. in animals <1 month as oocysts per gram of faeces, because of the large numbers of oocysts excreted, and therefore these data were not included in the statistical analysis, and only the data from adult animals were compared.

For the river water samples, the normality of the data was tested with the Kolmogorov–Smirnov test. For normally distributed results, differences in the concentrations of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* at the different points and throughout the year were compared by pairwise multiple comparison procedures (Student–Newman–Keuls method) and one-way ANOVA. Results that did not comply with the assumptions of normality were tested by Kruskal–Wallis test (non-parametric ANOVA) and Dunn's Multiple Comparison test.

In all cases, analyses were carried out with GraphPad InStat® for Windows, version 3.05 (GraphPad Software, San Diego, CA), and differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

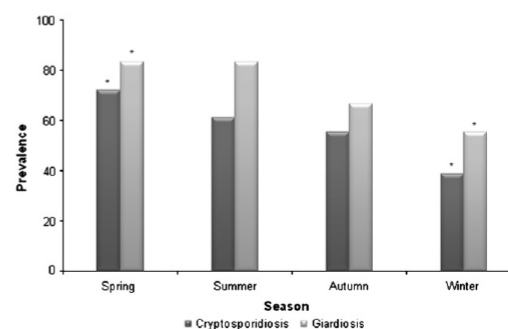
#### 3.1. Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in dairy cattle

Analysis of a single sample of each of the 1316 dairy cattle (neonatal calves, heifers and cows) selected at random during

the study period revealed that 85 and 123 animals were shedding *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts, respectively, i.e., the prevalence of cryptosporidiosis and giardiasis in the Tambre river basin was 6.5 and 9.3%, respectively. Throughout the year, *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected in 40 neonatal calves (28.8%), 20 heifers (4.2%) and in 25 cows (3.6%) from 18 dairy farms (100%). The mean intensity of oocyst shedding was 2 in the neonatal calves (2–5 oocysts per microscopic field at 1000× magnification), the intensity of infection in heifers and cows ranged between 2–100 and 5–84 oocysts per gram of faeces, respectively. *Giardia duodenalis* cysts were identified in 29 neonatal calves (20.9%), 45 heifers (9.4%) and in 49 cows (7.0%) from 18 dairy farms (100%). The number of cysts shed by neonatal calves ranged between 5 and 7895 cysts per gram of faeces, whereas the intensity of infection in heifers and cows ranged from 5 to 95 and from 5 to 82 cysts per gram of faeces. The mean prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* on farms within the river basin was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in spring than in winter (Fig. 1).

Considering the animals sampled at each time of year and independently of age (neonatal calves, heifers and cows), there was a significant association between the season when sampling was carried out and the prevalence of infection. Thus, the prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* was significantly higher in spring than in winter ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2). In spring only, *G. duodenalis* was significantly more prevalent than *Cryptosporidium* spp. ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2). However, considering the age of the animals, it was found that (only) the prevalence of cryptosporidiosis was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in neonatal calves than in adult animals (heifers and cows) in all seasons, and there were no seasonal patterns in neonatal cryptosporidiosis or giardiasis (Tables 1A–D).

Comparison of the 2 seasons in which the greatest numbers of parasitic forms were detected, revealed that in spring and summer *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected in 33 (9.4%) and 21 (6.0%) animals in 13 (72.2%) and 11 (61.1%) herds, respectively. The percentages of infection



**Fig. 1 – Seasonal prevalence of cryptosporidiosis and giardiasis on the farms within the river basin. Mean prevalences in different season indicated with an asterisk are significantly different from each other.**

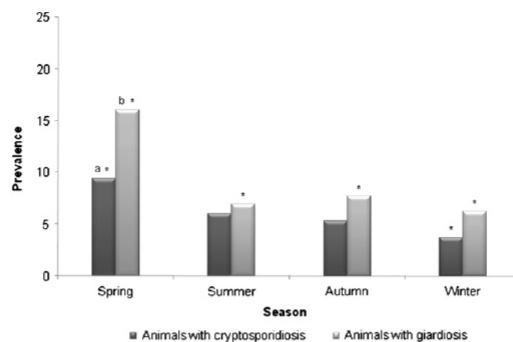


Fig. 2 – Seasonal prevalence of infection by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in dairy cattle farmed within the river basin. Means in the same season indicated with a different letter are significantly different. Mean prevalences in different seasons indicated with an asterisk are significantly different from each other.

according to age were: neonatal calves (23.8%; 20.0%); heifers (6.5%; 5.2%) and cows (8.2%; 4.4%). *Giardia duodenalis* was detected in 56 (16.0%) cattle in spring and in 24 (6.9%) animals in summer; in both seasons these animals belonged to 15 farms (83.3%). The prevalence according to age, in spring and summer was as follows: neonatal calves (21.4%; 23.3%), heifers (20.2%; 5.9%) and cows (11.9%; 4.9%), respectively. Cyst shedding was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in spring than in summer (5–7895 compared with 5–100 *G. duodenalis* cysts per gram of faeces) (Tables 1A,B).

### 3.2. Prevalence and concentration of parasite forms of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in river water samples

A total of 116 samples were collected, over a period of 1 year, from the main basin of the river Tambre (including 5 recreational areas); at the source and mouth of the 3 largest rivers and at the mouth of a secondary river. *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected in 62/116 (53.4%) samples from 27/29 (93.1%) sampling points throughout the year, whereas

Table 1 – Prevalence and intensity of infection by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in dairy cattle during the spring (A), summer (B), autumn (C) and winter (D).

Animals (number)	Prevalence (%)	Oocysts per gram of faeces		Prevalence (%)	Cysts per gram of faeces	
		Min–Max	Mean		Min–Max	Mean
A						
Neonatal calves (42)	23.8 <sup>a</sup>	1–4*	2.0*	21.4	14–7895	1423.7 <sup>b</sup>
Heifers (124)	6.5	6–13	8.1	20.2	5–95	22.6
Cows (184)	8.2	5–60	17.9	11.9	5–82	14.7
B						
Neonatal calves (30)	20.0 <sup>a</sup>	1–4*	2.5	23.3 <sup>a</sup>	5–100	36.8
Heifers (135)	5.2	3–100	36.6	5.9	5–58	25.1
Cows (181)	4.4	6–84	24.1	4.9	6–59	23.6
C						
Neonatal calves (35)	37.2 <sup>a</sup>	1–4*	2.5*	28.5 <sup>a</sup>	10–250	111.7
Heifers (114)	4.4	2–8	5.8	5.3	6–21	11.2
Cows (172)	1.2	1–3	2.0	5.2	5–21	12.1
D						
Neonatal calves (32)	34.4 <sup>a</sup>	1–4*	3.5*	9.4	10–40	21.6
Heifers (107)	0.0	0.0	0.0	5.6	6–9	7.3
Cows (160)	0.0	0.0	0.0	5.6	5–13	7.1

\*The intensity of infection in this group was evaluated semiquantitatively according to the average number of oocysts in 50 randomly selected fields at 1000× magnification (0: absence of oocysts; 1: ≤1 oocyst per field; 2: 2–5 oocysts per field; 3: 6–10 oocysts per field; and 4: >10 oocysts per field).

a The prevalence was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in heifers and cows.

b The intensity of infection was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in heifers and cows.



*G. duodenalis* cysts were detected in 78/116 (67.2%) samples from 29/29 (100%) sampling points, in the different seasons (Table 2). No empty (i.e., without internal characteristics, ghosts), *Cryptosporidium* spp. oocysts or *G. duodenalis* cysts were found in positive water samples. The concentrations of parasites at the sampled points ranged from 2 to 1350 *Cryptosporidium* spp. oocysts per litre and from 2 to 722 *G. duodenalis* cysts per litre (Table 2), most of them DAPI+ (91.0 and 93.0%, respectively). In the recreational river areas, the concentration of parasites ranged from 2 to 1200 oocysts per litre and from 2 to 400 cysts per litre, with highest numbers in spring, a time of year when many people use the areas (Table 2).

The distribution of results according to season revealed that at all sampling points, the highest numbers of (oo)cysts were found in spring and summer (Table 2). There was a significantly higher ( $P < 0.05$ ) prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts in samples collected in spring and summer than in samples collected in autumn and winter. Taken together these 2 seasons when most parasitic forms were detected, the infective stages of both parasites were detected in 29/29 (100%) of the points samples. In spring, infective stages of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* were detected in 26 (89.6%) and 27 (93.1%) samples, respectively.

The concentrations ranged between 2 and 1200 oocysts per litre and between 2 and 400 cysts per litre, with no significant difference between these. In summer, oocysts and cysts were detected in 20 (68.9%) and 25 (86.2%) samples, respectively. The concentrations at the different sampling points were similar and ranged from 2 to 1350 oocysts per litre and from 2 to 722 cysts per litre. In spring, when many animals are grazed in pastures and fertilize the land, very high levels of contamination were registered for both *Cryptosporidium* spp. (1200 oocysts per litre) and *G. duodenalis* (400 cysts per litre) in 2 recreational areas (Table 2).

### 3.3. Molecular identification of parasites in river water samples

PCR amplification of 18S SSU rRNA gene sequences was successful for samples containing *Cryptosporidium* spp. oocysts. For *G. duodenalis* isolates, PCR amplification of the 753-bp fragment of the  $\beta$ -giardin gene was performed. Samples that contained relatively high concentrations of nucleated (oo)cysts were selected for processing. Surface water samples were collected from 29 sampling points during spring and summer. At least 2 PCR products from each point

Table 2 – Detection of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in surface waters.

Sampling point*	Spring		Summer		Autumn		Winter	
	Oocysts per litre	Cysts per litre	Oocysts per litre	Cysts per litre	Oocysts per litre	Cysts per litre	Oocysts per litre	Cysts per litre
1	2	2	0	5	2	12	0	2
2	0	2	0	2	0	5	0	0
3	26	17	2	2	0	0	0	0
4	2	2	6	12	0	0	0	0
5	0	2	0	2	0	2	0	0
6	2	15	0	2	0	0	0	17
7	2	10	0	0	0	2	0	0
8	0	2	0	5	2	0	0	0
9	2	2	6	10	0	0	0	0
10	4	0	24	17	0	5	0	2
11	2	7	12	35	2	0	0	0
12	4	7	0	0	0	2	0	0
13	2	0	2	50	0	0	0	2
14	4	2	6	5	0	2	0	0
15	4	2	4	5	0	0	0	0
16	2	2	0	0	2	12	0	0
17	2	75	14	40	2	2	2	2
18	2	82	4	2	0	5	0	2
19	2	5	0	0	2	10	2	0
20	4	20	2	5	0	10	0	0
21	4	400	4	7	0	0	0	0
22	1200	10	2	2	2	0	2	0
23 (S <sup>1</sup> )	6	2	88	125	2	0	0	0
24 (M <sup>1</sup> )	2	12	1350	722	2	2	0	20
25 (S <sup>2</sup> )	6	22	2	7	2	0	0	17
26 (M <sup>2</sup> )	4	10	2	7	2	0	0	0
27 (S <sup>3</sup> )	2	2	6	10	2	20	0	15
28 (M <sup>3</sup> )	2	2	4	22	0	2	0	0
29 (M <sub>s</sub> )	2	25	4	50	4	10	0	7

\*1–17: points sampled in the main river; 18–22: recreational areas in the main river basin; (S) source or (M) mouth of the 3 largest rivers <sup>1, 2 or 3</sup>; (M<sub>s</sub>) mouth of a secondary river.

were sequenced. Unfortunately, sequencing of the DNA of (oo)cysts from only 17 points was achieved.

*Cryptosporidium parvum* was detected in 7 (41.2%) samples of surface water, *C. andersoni* and *C. hominis* in 6 (35.3%) and 4 (23.5%) of the samples, respectively (Table 3). As regards *G. duodenalis*, cysts of assemblage A-I and A-II were detected in samples from 2 (11.8%) to 4 (23.5%) of the points, respectively. Nevertheless, in another 4 samples (23.5%) 2 assemblages (A-I + E) were detected, and in another 5 samples (29.4%), assemblages A-II + E were detected. Assemblage E only was detected in 2 water samples (11.8%).

The results obtained by sequencing and/or PCR-restriction fragment length polymorphism of the samples of (oo)cysts in the main river were similar to those identified in recreational areas, and at the source and mouth of the rivers. Nevertheless, *C. hominis* was the predominant species in the recreational areas and *C. andersoni* was mainly detected in the rivers (Table 3).

#### 4. Discussion

The results of this study indicated that the Tambre river basin was highly contaminated with *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts (range = 2–1350 (oo)cysts per litre), which were viable and potentially infective to man and to domestic and wild ruminants. In outbreaks in Bradford (UK) and Milwaukee (USA), oocysts were detected in water samples at densities of less than 0.4 per litre (MacKenzie et al., 1994; Atherton et al., 1995). The range of concentrations of oocysts found in the present study is 5–3375 times higher than the 0.4 oocysts per litre known to have caused outbreaks. These data revealed the risk of a possible outbreak if people were to accidentally drink river water while bathing, playing or swimming. Moreover, the low infectious doses of both cryptosporidiosis and giardiasis would definitely facilitate the transmission of these parasites.

The Tambre river basin is an area of Galicia (NW, Spain) characterised by a high density of domestic animals, especially dairy cattle. The large number of farms, the large proportion of animals (neonatal calves, heifers and cows), and the large volume of faeces that they produce demonstrate the importance of dairy cattle as a potential source of environmental contamination and as a possible reservoir of infectious parasites (Fayer et al., 2000b; Castro-Hermida et al., 2006). This study examined the prevalence and concentrations of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in 18 dairy herds located in the same hydrographical basin in which pumping areas for plants of treatment of drinking water are located close to recreational areas, river beaches and in some cases grazing areas, mainly for cattle. Throughout the year, *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts were detected in all dairy farms (100%). We believe that this prevalence reflects a serious situation, taking into account that the study was carried out on animals and farms selected at random. Moreover, as only 1 faecal sample was collected per animal, the prevalence data probably underestimates the actual number of infected animals.

*Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts have been demonstrated in runoff from agricultural areas (Slifko et al., 2000; Fayer, 2004), and some outbreaks of cryptosporidiosis and giardiasis in humans have been attributed to contamination of drinking and bathing water with such effluents. In the present study, both pathogens were detected in neonatal calves, heifers and cows. Throughout the year, the mean excretion of *Cryptosporidium* spp. oocysts in neonatal calves was 2 (2–5 oocysts per microscopic field at 1000× magnification) and the mean intensity of infection by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in the different age groups ranged between 2 and 100 oocysts per gram and between 5 and 7895 cysts per gram of faeces, respectively, figures that are similar to those of previous studies carried out in cattle (O'Handley et al., 1999; Ralston et al., 2003; Castro-Hermida et al., 2006). Cattle may excrete up to 40 kg of faeces in a day, so a high degree of contamination can occur in the environment around farms; this represents a hazard to human health when contamination occurs with zoonotic species.

Considering the seasonal prevalence of infection by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in dairy cattle in the hydrographical basin and independently of age, the prevalence of cryptosporidiosis and giardiasis was significantly higher in spring than in winter. Although some authors have observed an increase in the prevalence of these infections during certain seasons, in relation to high rainfall or the number of births, seasonal effects can only be correctly evaluated if the studies are repeated over several consecutive years. In a year-long study on the prevalence of neonatal bovine cryptosporidiosis in France, Lefay et al. (2000) found that the lowest levels of parasitization were found in July and August. Nevertheless, the absence of seasonality in the presence of both infections has been described by Wade et al. (2000) in a study of 109 dairy farms in 5 regions in the south-east of New York State. The absence of notable climatic changes in Galicia throughout the year as well as the lack of a particular calving season and the fact that neonatal dairy calves are permanently stabled may explain these results (Castro-Hermida et al., 2002).

**Table 3 – Identification of species and genotypes of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* detected in surface waters.**

Sampling point*	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>G. duodenalis</i>
3*	<i>C. parvum</i>	A-I + E
4*, 6*, 13*, 18§	<i>C. parvum</i>	A-II + E
10*	<i>C. andersoni</i>	A-I + E
11*	<i>C. parvum</i>	A-I
17*	<i>C. andersoni</i>	A-II + E
20§	<i>C. hominis</i>	A-I + E
21§	<i>C. hominis</i>	E
22§	<i>C. hominis</i>	A-II
23 (S <sup>1</sup> )	<i>C. andersoni</i>	A-II
24 (M <sup>1</sup> )	<i>C. parvum</i>	A-I
25 (S <sup>2</sup> )	<i>C. andersoni</i>	A-I + E
26 (M <sup>2</sup> )	<i>C. andersoni</i>	A-II
28 (M <sup>3</sup> )	<i>C. hominis</i>	A-II
29 (M <sub>s</sub> )	<i>C. andersoni</i>	E

\*Points sampled in the main river basin; §: recreational areas in the main river basin; (S) Source or (M) mouth of the 3 largest rivers <sup>1, 2 or 3</sup>; (M<sub>s</sub>) mouth of a secondary river.

Most farms surveyed in the present study had direct access to river water and there were no barriers (i.e., buffer zones, vegetation) to prevent contamination of the water. In addition, manure is frequently washed away from these areas along well-defined drainage paths during rainfall events, and heifers and cows typically have free access to nearby streams. In this scenario, both dairy cattle manure and grazing heifers and cows -especially in spring and summer- may contribute to contamination of the river basin with (oo)cysts. Therefore, in order to reduce the risk of human infection from cattle faeces, it is recommended that cattle farm owners apply good manure management practices. Direct access of cattle to watercourses should be controlled (e.g., rotational grazing, off-site watering, access ramps, fencing). Only decomposed manure should be used as fertilizer for fresh vegetable and fruit crops. These steps should be taken seriously so as to curb contamination of parasites from cattle farms into the river basin.

On the other hand, the analysis of 116 samples collected over a period of 1 year from the main basin of the river Tambre (including 5 recreational areas), the source and mouth of the 3 largest rivers and at the mouth of 1 secondary river, revealed *Cryptosporidium* spp. oocysts in 53.4% of the samples from 93.1% sampling points throughout the year, and *G. duodenalis* cysts in the 67.2% of the samples from 100% of the sampling points in the different seasons. In contrast, the occurrence that we report for river water samples is higher than reported in different countries or zones (LeChevallier et al., 1991; Ono et al., 2001; Briancesco and Bonadonna, 2005; Farizawati et al., 2005; Karanis et al., 2002, 2006). This contradiction can probably be explained by the underestimation of prevalence in other geographic zones because of the small numbers of samples analysed at one point. In this study, all sampling points were located in the same river basin, and monitoring was carried out during all 4 seasons of the year. The results of the examination of all the river water samples, along with the results obtained in dairy cattle confirm that infections by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* are widespread throughout this region of Spain, with giardiasis being more widespread and occurring at greater intensity of infection than cryptosporidiosis. This is similar to findings reported for other countries (Fayer, 2004; Giovanni et al., 2006).

The high prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts in the Tambre river basin may be related to the fact that livestock farming, especially dairy cattle farming is predominant in the area. Nevertheless, uncontrolled contaminations via wild animals cannot be discounted (Ruecker et al., 2007). Moreover, the area includes wastewater treatment plants, which could contribute to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* (Castro-Hermida et al., 2008).

The high mean concentrations of *Cryptosporidium* spp. oocysts (2–1350 oocysts per litre) and *G. duodenalis* cysts (2–722 cysts per litre) (of which 91.0 and 93.0%, respectively, were viable) in the river basin is a matter of public health concern. The infectious dose has been estimated to be as low as 10 (oo)cysts for *Cryptosporidium* spp. (Fayer et al., 2000a) and *G. duodenalis* (Adam, 2001). During recent years, several waterborne outbreaks by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* have been documented worldwide (Fayer, 2004; Yoder et al., 2004; Giangaspero et al., 2007; Sunderland et al., 2007). Nevertheless,

in Spain very few epidemiological surveys have been carried out to establish the occurrence of these protozoa in drinking water, and no significant waterborne outbreaks of cryptosporidiosis or giardiasis have been reported (Rodríguez-Hernández et al., 1994, 1996; Montemayor et al., 2005; Gómez-Couso et al., 2005, 2006; Carmena et al., 2007).

Although *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* were found in large numbers of samples throughout the year, the greatest numbers of (oo)cysts were found in spring and summer. The seasonality of these parasites in waters has been investigated in a few studies, with diverse results. Although a similar seasonal pattern has been reported by some authors (Isaac-Renton et al., 1996; Cacciò et al., 2003; Montemayor et al., 2005; Carmena et al., 2007), it has not been confirmed by others (Hashimoto et al., 2001); thus, it is not clear whether or not seasonality is a general feature of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* contamination. In the present study, the high numbers of parasitic forms in river water in spring and summer coincide with the high rate of (oo)cyst shedding detected in cattle at these times of year. It is possible that the contamination in spring and summer is caused by agricultural-related activities (e.g., fertilization of cropped land with slurry). Since, at these times of year, many people use river beaches and recreational areas, especially during holiday periods, the monitoring of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* must be intensified during spring and summer.

The species and genotypes present in river water samples were identified by means of a molecular assay. Unfortunately, the DNA of (oo)cysts from only 17 sampling points was finally able to be sequenced. This may have been because of inhibitors present in the water, the small volumes used or to loss of parasites during concentration and purification before carrying out the PCR. Although PCR is a highly sensitive and useful technique, so far, we have only been able to apply it successfully to samples with a high parasite load, which makes purification of the oocysts/cysts easier. The PCR technique is therefore rather limited use with water samples containing low parasite loads.

*Cryptosporidium hominis*, formerly *C. parvum* genotype I or human, involved in the anthroponotic route of transmission, was the predominant species in the recreational areas, indicating a human source for this contamination that could be, at least in part, the origin of *C. parvum* contamination also detected. *Cryptosporidium andersoni*, which infects the bovine abomasum and is not known to infect animals other than cattle, was mainly detected in the rivers close to areas where dairy cattle farming predominates and that include several pastures and cultivated areas, which confirms the importance of dairy heifers and milking cows in the transmission of animal cryptosporidiosis in rural areas. Nevertheless, *C. parvum* was the most prevalent species in the river basin. *Cryptosporidium parvum* infects the small intestine, mainly of pre-weaned calves, although also human and other animals, often causing diarrhoeal disease (Castro-Hermida et al., 2002; Santín et al., 2004). As regards *G. duodenalis*, assemblages A-I (zoonotic), A-II (anthroponotic) and E (only infects livestock, cats and rats) were detected in the sampling area. The most commonly detected genotypes of *G. duodenalis*, i.e., assemblages A and B, have the widest host ranges, including humans and a variety of other animals, including cattle.



Assemblage E has been reported only in livestock (Monis et al., 2003; Trout et al., 2005). The present study demonstrates a high degree of contamination by *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in the river basin studied. Moreover, cattle were an important source of contamination as can be deduced from the identification of species and assemblages. Indeed, in 13/29 (44.8%) of sampling points were identified *C. andersoni* and/or *G. duodenalis* assemblage E, which only infect livestock. We therefore recommend protection of watersheds used for potable water, and adequate and continuous monitoring of river water in order to control the spread of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts.

## 5. Conclusions

The present study demonstrates the importance of monitoring the presence of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in cattle, independently of the age of the animals, as well as in water destined for human consumption, for recreational purposes and in waterways used by the farmers (water channel, animal drinking water and drainage systems). Monitoring of both parasites is particularly important in stretches of rivers used as sources of drinking water, i.e., where water is pumped to drinking water treatment plants or to water storage deposits. Such monitoring should be carried out at least during spring and summer, as well in special situations, e.g., following floods, fire, uncontrolled release of manure or effluents from sewage treatment plants, in order to prevent infection by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* and thus prevent risks to human and animal health. Finally, it is important that health authorities rethink the relevance of levels of contamination by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in surface waters and develop adequate countermeasures.

## Acknowledgements

The present study was financially supported by the Xunta de Galicia, through the Consellería de Innovación e Industria (PGIDIT05RAG50306PR), Ministerio de Ciencia e Innovación, within the Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias (RTA2006-00007-00-00) and by the Fondo Social Europeo.

## REFERENCES

- Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14, 447–475.
- Atherton, F., Newman, C.P.S., Casemore, D.P., 1995. An outbreak of waterborne cryptosporidiosis associated with a public water supply in the UK. Epidemiol. Infect. 115, 123–131.
- Briancesco, R., Bonadonna, L., 2005. An Italian study on *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater, fresh water and treated water. Environ. Monit. Assess. 104, 445–457.
- Cacciò, S.M., De Giacomo, M., Pozio, E., 2002. Sequence analysis of the  $\beta$ -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int. J. Parasitol. 32, 1023–1030.
- Cacciò, S.M., De Giacomo, M., Aulicino, F.A., Pozio, E., 2003. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3393–3398.
- Carmena, D., Aguinalde, X., Zigorraga, C., Fernández-Crespo, J.C., Ocio, J.A., 2007. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. J. Appl. Microbiol. 102, 619–629.
- Castro-Hermida, J.A., González-Losada, Y., Ares-Mazás, E., 2002. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). Vet. Parasitol. 106, 1–10.
- Castro-Hermida, J.A., Delafosse, A., Pors, I., Ares-Mazás, E., Chartier, C., 2005. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. Vet. Rec. 157, 623.
- Castro-Hermida, J.A., Carro-Corral, C., González-Warleta, M., Mezo, M., 2006. Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Galicia (NW, Spain). J. Vet. Med. B 53, 244–246.
- Castro-Hermida, J.A., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia da Costa, J.M., Rumbo-Lorenzo, C., Mezo, M., 2007a. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. Parasitol. Res. 101, 1443–1448.
- Castro-Hermida, J.A., González-Warleta, M., Mezo, M., 2007b. Natural infection by *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in sheep and goats in Galicia (NW Spain). Small Rumin. Res. 72, 96–100.
- Castro-Hermida, J.A., García-Precedo, I., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia da Costa, J.M., Mezo, M., 2008. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. Water Res. 42, 3528–3538.
- Center of Disease Control and Prevention, 2006. Fact sheet—crypto-protection against recreational water illness. <http://www.cdc.gov/healthyswimming/cryptofacts.htm> [Online].
- Enriquez, C., Nwachuku, N., Gerba, C.P., 2001. Direct exposure to animal enteric pathogens. Rev. Environ. Health 16, 117–131.
- Farizawati, S., Lim, Y.A.L., Ahmad, R.A., Fatimah, C.T.N.I., Siti-Nor, Y., 2005. Contribution of cattle farms towards river contamination with *Giardia* oocysts and *Cryptosporidium* oocysts in Sungai Langat Basin. Trop. Biomed. 22, 89–98.
- Fayer, R., 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet. Parasitol. 126, 37–56.
- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J., 2000a. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int. J. Parasitol. 30, 1305–1322.
- Fayer, R., Trout, J.M., Graczyk, T.D., Lewis, E.J., 2000b. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. Vet. Parasitol. 93, 103–112.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M., Greiner, E., 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1–2-year-old dairy cattle in the eastern United States. Vet. Parasitol. 135, 105–112.
- Giangaspero, A., Berrilli, F., Brandonisio, O., 2007. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. Parasitol. Res. 101, 1169–1182.
- Giovanni, G.D., Betancourt, W.Q., Hernandez, J., Assadian, N.W., Flores Margez, J.P., Jaramillo Lopez, E., 2006. Investigation of potential zoonanthropotic transmission of cryptosporidiosis and giardiasis through agricultural use of reclaimed wastewater. Int. J. Environ. Health Res. 16, 405–418.
- Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Castro-Hermida, J.A., Ares-Mazás, E., 2005. *Giardia* in shellfish-farming areas: detection in mussels, river water and waste waters. Vet. Parasitol. 133, 13–18.

- Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Castro-Hermida, J.A., Ares-Mazás, E., 2006. *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. *J. Food Prot* 69, 185–190.
- Hancock, D., Besser, T., Lejeune, J., Davis, M., Rice, D., 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int. J. Food Microbiol* 66, 71–78.
- Hashimoto, A., Hirata, T., Kunikane, S., 2001. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in a conventional water purification plant. *Water Sci. Technol* 43, 89–92.
- Heine, J., 1982. Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien in Kot. *Zentralbl. Veterinärmed. Reihe B* 29, 324–327.
- Isaac-Renton, J., Moorehead, W., Ross, A., 1996. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two community drinking water supplies: cysts levels, parasite viability, and health impact. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 47–54.
- Karanis, P., Papadopoulos, C., Kimua, A., Economou, E., Kourenti, C., Sakkas, H., 2002. *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural, drinking and recreational water of northwestern Greece. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 30, 49–58.
- Karanis, P., Sotiriadou, I., Kartashev, V., Kourenti, C., Tsvetkova, N., Stojanova, K., 2006. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environ. Res.* 102, 260–271.
- LeChevallier, M.W., Norton, N.D., Lee, R.G., 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2610–2616.
- Lefay, D., Naciri, M., Poirier, P., Chermette, R., 2000. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. *Vet. Parasitol* 89, 1–9.
- MacKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., Davis, J.P., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med* 331, 161–167.
- McQuin, R.M., Clancy, J.L., 2003. Modifications to United States Environmental Protection Agency Methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 267–274.
- Meyer, E.A., Jarroll, E.J., 1980. Giardiasis. *Am. J. Epidemiol* 111, 1–12.
- Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Ey, P.L., 2003. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect. Genet. Evol.* 3, 29–38.
- Montemayor, M., Valero, F., Cofre, J., Lucena, F., 2005. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1455–1462.
- O'Handley, R.M., Cockwill, C., McAllister, T.A., Jelinski, M., Morck, D.W., Olson, M.E., 1999. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214, 391–396.
- Ono, K., Tsuji, H., Rai, S.H., Yamamoto, A., Masuda, K., Endo, T., Hotta, H., Kawamura, T., Uga, S., 2001. Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in western Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3832–3836.
- Ralston, B.J., McAllister, T.A., Olson, M.E., 2003. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in beef calves and their dams. *Vet. Parasitol* 114, 113–122.
- Reynolds, K.A., Mena, K.D., Gerba, C.P., 2008. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev. Environ. Contam. Toxicol* 192, 117–158.
- Rodríguez-Hernández, J., Canut-Blasco, A., Ledesma-García, M., Martín-Sánchez, A.M., 1994. *Cryptosporidium* oocysts in water for human consumption. Comparison of staining methods. *Eur. J. Epidemiol* 10, 215–218.
- Rodríguez-Hernández, J., Canut-Blasco, A., Martín-Sánchez, A.M., 1996. Seasonal prevalences of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in children attending day care centres in Salamanca (Spain) studied for a period of 15 months. *Eur. J. Epidemiol* 12, 291–295.
- Ruecker, N.J., Braithwaite, S.L., Topp, E., Edge, T., Lapen, D.R., Wilkes, G., Robertson, W., Medeiros, D., Sensen, C.W., Neumann, N.F., 2007. Tracking host sources of cryptosporidium spp. in raw water for improved health risk assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3945–3957.
- Santín, M., Trout, J.M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R., 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasitol* 122, 103–117.
- Slifko, T.R., Smith, H.V., Rose, J.B., 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int. J. Parasitol* 30, 1379–1393.
- Smith, H.V., Cacciò, S.M., Cook, N., Nichols, R.A.B., Tait, A., 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet. Parasitol* 149, 29–40.
- Sunderland, D., Graczyk, T.K., Tamang, L., Breyse, P.N., 2007. Impact of bathers on levels *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts in recreational beach waters. *Water Res.* 41, 3483–3489.
- Tamburrini, A., Pozio, E., 1999. Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol* 29, 711–715.
- Thompson, R.C.A., 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol* 30, 1259–1267.
- Trout, J.M., Santín, M., Greiner, E., Fayer, R., 2005. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in post-weaned dairy calves. *Vet. Parasitol* 130, 177–183.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2001. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. EPA 821-R-01-025. Office of Ground Water and Drinking Water Technical Support Center, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Wade, S.E., Mohammed, H.O., Schaaf, S.L., 2000. Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (C. andersoni) in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. *Vet. Parasitol* 93, 1–11.
- World Health Organization, 2002. Guidelines for Drinking Water Quality; Addendum-Microbial Agents in Drinking Water, second ed. Switzerland, Geneva.
- Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C.A., Fayer, R., Lal, A., 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3386–3391.
- Yoder, J., Blackburn, B., Gunther, G., Hill, V., Levy, D., Chen, N., 2004. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water – United States, 2001–2002. Washington, DC.



**Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*.**

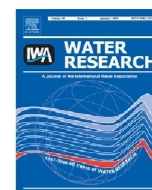
Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, L.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M.

***Water Research*, 42: 3528-3538. 2008.**



La finalidad de este estudio fue conocer la repercusión de las aguas residuales depuradas a la contaminación por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. de una cuenca hidrográfica. Durante las diferentes estaciones del año 2007, se acudió a todas las EDARs (n=12) existentes en el sistema de explotación hidrográfica seleccionado. Se recogieron un total de 48 muestras en el afluente y otras 48 muestras en el efluente. En cada EDAR, se cumplimentó un cuestionario sobre las características generales de la instalación y las condiciones de mantenimiento. Se detectó la presencia de ambos enteropatógenos tanto en el agua de entrada como en el agua de salida de todas las depuradoras (100%), observándose que en el afluente la concentración de *Giardia* spp., en todas las muestras analizadas, fue significativamente mayor ( $P<0,05$ ) que la detectada para *Cryptosporidium* spp. Sorprendentemente, en los efluentes se observaron concentraciones medias por litro elevadas, así, los resultados obtenidos para *Cryptosporidium* spp. estuvieron comprendidos entre 2-390 OPL mientras que en el caso de *Giardia* spp. estos valores oscilaron entre 79-2.469 QPL. Se comprobó que al menos un 87,0% de los ooquistes y un 90,0% de los quistes eliminados a la cuenca hidrográfica permanecen potencialmente viables tras los diferentes procesos de tratamiento aplicados en las depuradoras. Se identificaron tres especies de *Cryptosporidium* (*C. andersoni*, *C. hominis* y *C. parvum*) y una especie de *Giardia* (*G. duodenalis*), aunque se observaron dos genotipos de esta especie: A (subtipos A-I y A-II) y E.



Available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.elsevier.com/locate/watres](http://www.elsevier.com/locate/watres)

## Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*

José Antonio Castro-Hermida<sup>a,\*</sup>, Ignacio García-Preseado<sup>a</sup>, André Almeida<sup>b</sup>,  
Marta González-Warleta<sup>a</sup>, José Manuel Correia Da Costa<sup>b</sup>, Mercedes Mezo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo-Xunta de Galicia, Carretera AC-542 de Betanzos a Mesón do Vento, Km 7, 5. CP 15318 Abegondo (A Coruña), Spain

<sup>b</sup>Centro de Imunología e Biología Parasitaria-INSA, Porto, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 March 2008

Received in revised form

24 April 2008

Accepted 2 May 2008

Available online 14 May 2008

#### Keywords:

*Cryptosporidium* spp.

*Giardia duodenalis*

Recreational river areas

Wastewater

Water quality

Public health

Spain

### ABSTRACT

Samples of the influent and final effluent from 12 wastewater treatment plants from Galicia (NW, Spain) were analyzed for the presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia duodenalis* cysts. All of the plants discharge effluent to a hydrographic basin in which there are numerous recreational areas and fluvial beaches. The samples (25–50 liters) were collected in spring, summer, autumn and winter of 2007. A total of 96 samples were analyzed using techniques included in the US Environmental Protection Agency Method 1623. To identify the genotypes present, the following genes were amplified and sequenced: 18S SSU rRNA (*Cryptosporidium* spp.) and  $\beta$ -giardina (*G. duodenalis*). Both parasites were detected in influent and effluent samples from all treatment plants (100%) throughout the year, and *G. duodenalis* always outnumbered *Cryptosporidium* spp. The mean concentration of *G. duodenalis* per liter of influent was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the mean concentration of *Cryptosporidium* spp. per liter of influent. The mean concentrations of parasites in influent samples ranged from 6 to 350 *Cryptosporidium* spp. oocysts per liter and from 89 to 8305 *G. duodenalis* cysts per liter. In final treated effluent, the mean concentration of parasites ranged from 2 to 390 *Cryptosporidium* spp. oocysts per liter and from 79 to 2469 *G. duodenalis* cysts per liter. The distribution of results per season revealed that in all plants, the highest number of (oo)cysts were detected in spring and summer. *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium hominis* and assemblages A-I, A-II, E of *G. duodenalis* were detected. The risk of contamination of water courses by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* is therefore considerable. It is important that wastewater treatment authorities reconsider the relevance of the levels of contamination by both parasites in wastewater, and develop adequate countermeasures.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* are major causes of diarrheal disease in humans and animals worldwide,

and major causes of protozoan waterborne diseases (Fayer, 2004; Smith et al., 2007; Reynolds et al., 2008). These parasites are transmitted through contaminated water and food, in addition to the classical fecal-oral route. Transmission is

\*Corresponding author. Tel.: +34 981 647 902x248; fax: +34 981 673 656.

E-mail address: [jose.antonio.castro.hermida@xunta.es](mailto:jose.antonio.castro.hermida@xunta.es) (J.A. Castro-Hermida).

0043-1354/\$ - see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2008.05.001

sustained by both zoonotic and anthroponotic cycles (Fayer et al., 2000; Slifko et al., 2000; Thompson, 2000). The infected hosts, whether humans and animals, shed very large numbers of transmissible stages—oocysts of *Cryptosporidium* spp. and cysts of *G. duodenalis*—in their feces, thereby increasing the degree of environmental contamination. Moreover, the (oo)cysts are insensitive to conventional wastewater treatment processes and disinfectants, at least at the concentrations commonly used in water treatments plants to reduce bacterial contamination (Karanis et al., 2002; WHO, 2002; Center of Disease Control and prevention, 2006), although it has been shown that *G. duodenalis* cysts are less resistant than *Cryptosporidium* spp. oocysts (Sterling, 1990) to higher concentrations of chlorine and ozone. *G. duodenalis* cysts have been shown to survive in water for up to 2 months at temperatures as low as 8 °C (Meyer and Jarroll, 1980) and *Cryptosporidium* spp. oocysts can survive for up to 1 year at 4 °C in artificial seawater (Tamburrini and Pozio, 1999).

Depending on the efficiency of the conventional wastewater treatment at the plants, (oo)cysts may pass through the treatment process and enter surface waters (i.e., sources of drinking water, rivers, in which there may be pumping areas for drinking water treatment plants, or recreational waters), leading to potential infection of humans. Moreover, in industrialized countries, use of treated wastewater for domestic, industrial and agricultural purposes is nowadays the most important method of reusing wastewater, when sanitary and environmental guarantees are given.

*Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* have been detected in irrigation water, effluents from wastewater treatment plants and biosolids from wastewater treatment plants (Chauret et al., 1999; Cacciò et al., 2003; Quintero-Betancourt et al., 2003), and therefore, there is a risk that reclaimed wastewater applied to agricultural land may contain these as well as other pathogens. Forage food may thus become contaminated, leading to disease in livestock. Infected animals may then amplify the numbers of pathogens and contaminate the environment, including surface waters, or spread food-borne disease if the quality of meat processing and handling is compromised. Infected animals may also serve as reservoirs of the pathogen, and although they may not show obvious signs of disease or clinical symptoms (Castro-Hermida et al., 2005, 2007a,b), they may ultimately spread the pathogens to human food (Hancock et al., 2001) or directly to humans (Enriquez et al., 2001). Furthermore, the infectious dose (ID<sub>50</sub>) has been estimated to be as low as 83–132 oocysts for *Cryptosporidium* spp. (DuPont et al., 1995; Chappell et al., 2006) and 19–50 cysts for *G. duodenalis* (Adam, 2001).

There are no requirements for testing recreational waters for these parasites, although it has been shown that these pathogens can be shed into recreational water during outbreaks (Yoder et al., 2004; Craun et al., 2005; Sunderland et al., 2007). Unlike swimming pools, recreational beach areas have underlying sediment that may contain up to 1000 times as many fecal bacterial or parasitic indicators as the overlying water (Indest, 2003). Disturbance of this sediment may lead to re-suspension of bacterial coliforms and of (oo)cysts, contributing to the higher concentrations in water (Brookes et al., 2004; Fayer, 2004; Giangaspero et al., 2007).

Outbreaks may occur during malfunctioning of treatment plants, which would enable the parasites to bypass the treatment processes more easily. Wastewater treatment plants have the potential to be a source of contamination to watersheds if the effluents are not treated adequately before they are discharged into nearby rivers or ponds. The objectives of the present study were to evaluate the prevalence and concentrations of *Cryptosporidium* spp and *G. duodenalis* in 12 wastewater treatment plants whose effluents are discharged into a hydrographical basin where there are several recreational areas, river beaches and pumping areas for drinking water treatment plants, in order to estimate the efficiency of treatment plants in removing these protozoans and to determine which species and genotype of the parasites are present, by means of a molecular assay.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sample collection

Samples were collected at 12 wastewater treatment plants (WTP). All of the WTP analyzed are located in the Tambre River hydrographic basin, which is one of the most important basins in this study region (Galicia, NW Spain). The principal river in the basin was declared a Site of Community Importance (SCI), by the European Commission Habitats Directive (92/43/EEC) in 2001. However, all of the final effluents from the WTP are discharged into the hydrographical basin, where there exist several recreational areas, river beaches and pumping areas for drinking water treatment plants, being 185,695 people whose drinking water supply is provided from the principal river (Fig. 1).

Two samples (25–50 liters), one of untreated wastewater (influent) and other of treated water (final effluent), were collected in each WTP during the spring, summer, autumn and winter of 2007 (24 samples per season). To be able to examine the wastewater at the same stage of the treatment process, when collecting the samples, the holding times of each step in the process were respected.

The specific steps in the treatment process used in each of the 12 plants are described in Table 1. The wastewater samples were filtered through Filta-Max filters (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA) with the aid of a motorized pump located on the inlet side of the filter. Samples were taken immediately to the laboratory and processed by the Filta-Max Automatic System (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA). Filtration cartridges were used according to the manufacturer's instructions, and all samples were filtered at recommended flow rates. The filter elution and final concentration of the sample were performed with the same equipment, and by following the manufacturer's instructions. Briefly, a membrane filter (3-μm pore size; polysulfone) was placed in the base of the sample concentrator, the filter module was inserted into the apparatus, 600 ml of phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.01% Tween 20 (PBST) was added to the reservoir, and the filter housing was unscrewed to allow expansion of the foam pads contained within. The foam pads were washed by pumping the plunger and then transferring the PBST elution volume

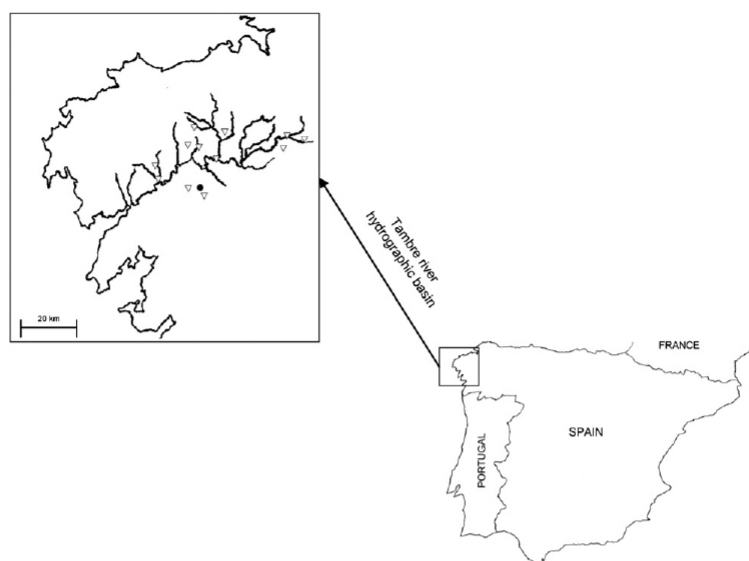


Fig. 1 – Geographic location of the wastewater treatment plants (▽) in the Tambre River hydrographic basin (Galicia; NW Spain). All of them were sampled in this study. Santiago de Compostela (●), with 93,458 inhabitants, is the main city in this area.

Table 1 – Main features of the treatment plant processes

Plant	Loading/ population equivalent	Primary treatment	Secondary treatment	Tertiary treatment	Use of treated water
1	30,191	Screening, grit separation and sedimentation	Activated sludge and sedimentation	None	Discharged to the river, agriculture irrigation
2	4652	Screening and grit separation	Oxidation with O <sub>2</sub> and sedimentation	Ultraviolet	Discharged to the river, agriculture irrigation
3	2410	Screening	Oxidizing beds	None	Discharged to the river, agriculture irrigation
4	6481	Screening and grit separation	Activated sludge and sedimentation	None	Discharged to the river, agriculture irrigation
5	12,294	Screening, grit separation and sedimentation	Activated sludge and sedimentation	None	Discharged to the river
6	6526	Screening and grit separation	Activated sludge and sedimentation	None	Discharged to the river
7	93,458	Screening, grit separation and sedimentation	Activated sludge and sedimentation	Ultraviolet	Discharged to the river, agriculture irrigation
8	2289	Screening and sedimentation	Biological aerated filters	None	Discharged to the river, restoration and agriculture irrigation
9	4548	Screening and grit separation	Oxidation with O <sub>2</sub>	None	Discharged to the river and agriculture irrigation
10	3557	Screening	Oxidation with O <sub>2</sub>	None	Discharged to the river and agriculture irrigation
11	4580	Screening and grit separation	Oxidation with O <sub>2</sub> and sedimentation	Ultraviolet	Discharged to the river
12	1496	Screening	Oxidizing beds	None	Discharged to the river

into the magnetic particle concentrator and filtering the entire volume to approximately 20–25 ml under vacuum. The process was repeated with a second 600-ml volume of PBST,

which was pooled with the first concentrate and then filtered under vacuum to produce a final volume of around 20 ml. The concentrate was then transferred into a 50-ml centrifuge



tube, the filter membrane was transferred to a small sealable plastic bag, and 8–10 ml of PBST added. The membrane was kneaded manually, and the spent wash volume was pooled with the primary eluate. The membrane washing procedure was repeated twice. The sample was resuspended to 50 ml with PBST and centrifuged at 1500g for 5 min. The supernatant was aspirated to 10 ml, and the resuspended pellet was transferred to a Leighton tube and processed by immunomagnetic separation technology (IMS).

## 2.2. Sample analysis for presence of parasites

The IMS procedure was performed as described in US EPA method 1623 (USEPA, 2001). Briefly, each 10-ml sample concentrate was added to a Leighton tube containing 1 ml of  $10 \times$  SL buffer A and 1 ml of  $10 \times$  SL buffer B (Dynabeads<sup>®</sup> GC-Combo, Invitrogen Dynal, A.S., Oslo, Norway). One hundred microliters of *Cryptosporidium* and *Giardia* IMS beads were added to each tube, and samples were incubated for 1 h at room temperature with constant rotation. The Leighton tubes were then placed in a magnetic particle concentrator and gently rocked for 2 min through a  $90^\circ$  angle. The supernatant was decanted, the tubes were removed from the magnetic particle concentrator, and 1 ml of  $1 \times$  SL buffer A was added to each. The tubes were gently rocked to resuspend the bead-(oo)cyst complexes, the suspension was transferred into a 1.5 ml polypropylene tube with a Pasteur pipette, then the tubes were placed in a second magnetic particle concentrator and rocked for 1 min. Supernatants were aspirated, the magnet was removed, and 50  $\mu$ l of 0.1 N HCl was added to each sample, which was vortexed for a minimum of 10 s. Samples were allowed to stand for 10 min in an upright position and vortexed for a further 10 s, and magnets were inserted. The tubes were allowed to stand undisturbed for 2 min. The beads collected at the back of the tube and the acidified suspension was transferred to the wells, of a two-welled slide, containing 5  $\mu$ l 1.0 N NaOH.

## 2.3. Staining procedure for recovered (oo)cysts

The samples were dried, fixed in acetone, and 50  $\mu$ l of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-*Cryptosporidium* sp. and anti-*Giardia* sp. MAbs (Aqua-Glo; Waterborne Inc., New Orleans, LA) was placed in each well. The slides were placed in a humidified chamber and incubated (37 °C for 45 min), then excess FITC-MAb was aspirated off. Any remaining FITC-MAb was removed by adding 50  $\mu$ l of PBS to each well, allowing the slides to stand for 5 min, and aspirating the excess PBS. A 50  $\mu$ l aliquot of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution (0.4  $\mu$ g/ml in PBS) was placed in each well. The slides were allowed to stand at room temperature for 15 min, and excess DAPI solution was removed by washing the slides twice in PBS and once in distilled water. The slides were placed in the dark until dry, a 10  $\mu$ l aliquot of mounting medium (2% diazabicyclooctane [DABCO] in 60% glycerol 40% PBS) was placed in each well, and slides were sealed for subsequent examination under epifluorescence optics, as described in method 1623 (USEPA, 2001). *Cryptosporidium* sp. oocysts were identified on the basis of their size, shape, and the presence of a suture on the oocyst

wall, at a magnification of  $\times 400$  using a Nikon Eclipse 90i microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). *Giardia* sp. cysts were identified by their size, shape and the pattern and intensity of immunofluorescence staining (i.e., bright green fluorescence of the cyst wall). Parasites in each slide well were enumerated, and the mean number obtained for the replicates was used to extrapolate to concentrations of parasites per liter of sample. Positive and negative controls, as recommended in the Method 1623, were used.

According to McCuin and Clancy (2003), using Filta-Max system and IMS, the mean recovery percentages of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts from source water samples, were  $50 \pm 13\%$  and  $41 \pm 9\%$ , respectively.

## 2.4. DNA extraction

For selected samples that contained relatively high concentrations of nucleated (oo)cysts, the remaining untreated wastewater (influent) or final effluent (which had not been examined) was concentrated by centrifugation. The parasites were isolated by IMS (Dynabeads<sup>®</sup> GC-Combo, Invitrogen Dynal, A.S., Oslo, Norway), according to the manufacturer's instructions; the beads were also washed before dissociation of the beads and parasites, and the isolated parasites were resuspended in Tris-EDTA buffer. DNA was isolated with a QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini kit (QIAGEN GmbH, Germany), according to the manufacturer's instructions.

## 2.5. Gene amplification and sequencing

*Cryptosporidium* species and genotypes were determined by a technique based on PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of the small-subunit (SSU) ribosomal RNA gene (18S SSU rRNA). A two-step nested PCR protocol was used to amplify an 830 bp fragment of the 18S SSU rRNA gene with primers 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' and 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAG GA-3' for primary PCR and 5'-GGAAGGGTTGTATTATTAGATAAAG-3' and 5'-AAGGAGTAA GGAACAACCTCC A-3' for secondary PCR (Xiao et al., 1999). The primary PCR mixture contained  $1 \times$  PCR buffer, 6 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M of (each) deoxynucleoside triphosphate, 100 nM (each) primer, 2U of Taq polymerase (New England BioLabs), and 10  $\mu$ l of purified DNA in a final volume of 50  $\mu$ l. Each of 45 cycles consisted of 94 °C for 40 s, 55 °C for 40 s, and 72 °C for 1 min 30 s after an initial hot start at 94 °C for 4 min and ending with 72 °C for 7 min. A secondary PCR product was then amplified from 5  $\mu$ l of the primary PCR. The secondary PCR mixture was identical except that the concentration of  $MgCl_2$  was 3 mM. Each of 45 cycles consisted of 94 °C for 40 s, 55 °C for 40 s, and 72 °C for 1 min after an initial hot start at 94 °C for 4 min and ending with 72 °C for 7 min.

For molecular typing of *G. duodenalis* a semi-nested PCR and partial sequencing of the  $\beta$ -giardin locus were performed (Cacciò et al., 2002). In the primary reaction, a 753 bp fragment was amplified with the forward primer G7 5'-AAGCCCGAC-GACCTCACCGCAGTGC-3', 3' and the reverse primer G759 5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'. In the sequential semi-nested PCR reaction, a 384 bp fragment was amplified with the forward inner primer G376 5'-CATAACGACGC-CATCGGGCTCTCAGGAA-3' and the reverse primer G759, as



previously described by Cacciò et al. (2002). The PCR mix contained  $1 \times$  PCR buffer, 3 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M (each) deoxynucleoside triphosphate, 200 nM of each primer, 2.5 units of Taq polymerase (New England BioLabs), and 5  $\mu$ l of purified DNA as a template for primary steps and 2.5  $\mu$ l of primary PCR product for secondary steps, in a final volume of 50  $\mu$ l. PCR was performed as follows: initial denaturation step of 94 °C for 5 min, 40 cycles of 30 s at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 60 s and final extension cycle of 7 min at 72 °C.

In all cases, for each reaction, a negative control (water) and a positive control were added. The PCR products were resolved in to 1.2% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and the gel image recorded under UV light. Gel images were captured by a gel documentation system (Gel Doc XR system, BioRad).

Following successful PCR, the products were purified (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare Europe GmbH, Germany) and sequenced on both strands (MWG Biotech, Germany). Chromatograms and sequences were examined with Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) and BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>). Sequence searches were conducted with BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

## 2.6. Statistics

The Kolmogorov–Smirnov test was used to check the normality of the data. For normally distributed data differences in the concentrations of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in the final effluents from the influents in the WTPs throughout the year were compared by pairwise multiple comparison procedures (Student–Newman–Keuls method) and one-way ANOVA. Nevertheless, for results that did not fulfill assumptions of normality, the Kruskal–Wallis test (nonparametric ANOVA) and Dunn's multiple comparison test were applied.

The tests were carried out with GraphPad InStat® for Windows, version 3.05, and GraphPad Software, San Diego, CA, USA. Differences in the variables were considered significant at the 0.05 level of confidence.

## 3. Results

### 3.1. Prevalence of protozoans in wastewater samples

A total of 96 samples were collected from the untreated wastewater (influent) and final effluent of WTPs during a period of 1 year. *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts were detected in both influent and effluent samples from all plants (100%) throughout the year, and *G. duodenalis* always outnumbered *Cryptosporidium* spp.; moreover, the mean concentration per liter of *G. duodenalis* was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the mean concentration per liter of *Cryptosporidium* spp. in the influent. The mean concentrations of *Cryptosporidium* spp. oocysts per liter of influent sample ranged from 6 to 350 and of *G. duodenalis* cysts per liter, from 89 to 8305. In final treated effluent, the mean concentration of *Cryptosporidium* spp. oocysts per liter of sample ranged from 2 to 390 and of *G. duodenalis* cysts per liter, from 79 to 2469. The concentration of (oo)cysts per liter of untreated wastewater (influent) throughout the year did not differ significantly among the WTPs (Table 2).

In addition, the concentration of (oo)cysts per liter of final effluent throughout the four seasons of the year did not differ significantly among the WTPs, and therefore the treatments at each WTP were ineffective at removing these enteropathogens (Tables 1 and 2). Surprisingly, in four of the WTPs (33%) it was found that the concentration of (oo)cysts per liter was higher in the treated than in untreated water. Thus, in plants 1, 3 and 12, the concentration of *Cryptosporidium* spp. oocysts in the influent and effluent samples were, respectively 350

**Table 2 – Geometric mean, maximum (max) and minimum (min) numbers of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts in the influent and effluent samples of wastewater treatment plants over a period of 12 months**

Plant no.	Oocysts per liter						Cysts per liter					
	Influent (n = 4)			Effluent (n = 4)			Influent (n = 4)			Effluent (n = 4)		
	Mean	Max	Min	Mean	Max	Min	Mean	Max	Min	Mean	Max	Min
1	350 <sup>a</sup>	970	16	390	1120	20	6462	10,000	3450	1245	3600	227
2	138	400	3	85	200	20	2533	4000	1440	2469	6000	200
3	7 <sup>a</sup>	20	1	105	260	2	262 <sup>a</sup>	587	39	803	1184	13
4	12	23	3	3	5	2	927	2667	3	79	244	2
5	21	49	2	17	50	1	4240	8000	240	553	1100	195
6	62	178	4	33	94	2	3175	3920	2400	1136	2000	384
7	72	248	1	12	35	2	8305	14,400	2240	758	1867	34
8	15	46	1	6	16	1	89 <sup>a</sup>	164	4	238	578	24
9	6	8	4	2	3	1	3465	9000	800	341	880	3
10	56	160	1	7	20	1	3124	10,000	85	707	1440	50
11	128	380	1	18	54	1	2480	4000	320	723	973	400
12	31 <sup>a</sup>	112	1	47	120	1	129 <sup>a</sup>	448	2	1204	4360	5

<sup>a</sup> The concentration of (oo)cysts per liter was higher in the final treated effluent than in the untreated wastewater (influent); n: number of water samples.

and 390; 7 and 105, and 31 and 47 oocysts per liter, whereas in plants 3, 8 and 12, the concentrations of *G. duodenalis* cysts were, respectively, 262 and 803; 89 and 238, and 129 and 1204 cysts per liter (Table 2). In plants 3 and 12 the primary treatment did not include grit separation and sedimentation, and the secondary treatment consisted of filter beds or oxidizing beds and no disinfection process was applied. This type of sewage treatment was the least efficient at removing the pathogens in comparison with those used in the other plants, although the differences were not statistically significant.

The distribution of results by season revealed that in all WTPs, the highest numbers of (oo)cysts were detected in spring and summer (Fig. 2A and B). It was observed that there was a significantly higher ( $P < 0.05$ ) incidence of positive *Cryptosporidium* spp. oocyst samples in summer than in winter both for the influent and effluent, and there were no significant differences for the other two seasons (Fig. 2A). In the case of *G. duodenalis* the concentrations of cysts per liter was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in the

influent collected in spring than in that collected in winter (Fig. 2B).

All of the treatment processes carried out in the 12 WTPs during the different seasons were inefficient as there were no significant differences in the concentrations of (oo)cysts in the effluent and influent samples. A significant reduction ( $P < 0.05$ ) in the number of *G. duodenalis* cysts in the final effluent (1398 cysts per liter) relative to the untreated wastewater (4600 cysts per liter) was only observed in the spring. However, despite this significant difference, the large numbers of cysts that are still being discharged to the river and used for agriculture irrigation during this time of year indicate that the treatments are ineffective.

Comparison of the two seasons in which the highest numbers of parasite forms were detected, revealed that in spring the concentration of both forms in four of the WTP (30%) was higher in the treated water (16–120 oocysts per liter; 326–6000 cysts per liter) than in the untreated water (1–20 oocysts per liter; 2–1440 cysts per liter), although the differences were not significant. At this time of year, the

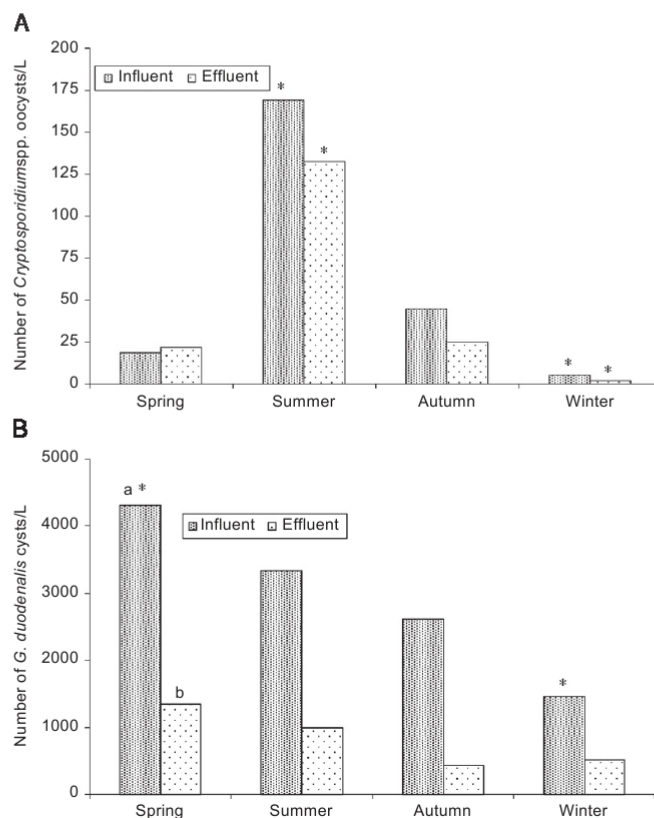


Fig. 2 – Removal efficacy of *Cryptosporidium* spp. oocysts (A) and *G. duodenalis* cysts (B) by wastewater treatment plants, according to season. Means in the same season with a different letter are significantly differences. Means in different season with an asterisk are significantly different between each other.

potential contamination of the hydrographic basin (considering only the final effluent) was between 1 and 120 *Cryptosporidium* spp. oocysts per liter (mean 22) and between 18 and 6000 *G. duodenalis* cysts per liter (mean 1.342) (Fig. 2A and B). In summer, at four WTPs (30%) the concentration of oocysts was slightly higher in the treated effluent (20–1120 oocysts per liter) than in the untreated water (3–970 oocysts per liter). A similar situation was observed at three WTPs (23%) for *G. duodenalis* (436–11,840 cysts per liter compared with 64–587 cysts per liter). Contamination of the hydrographic basin by *Cryptosporidium* spp. was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in summer, and concentrations of between 1 and 1120 oocysts per liter (mean 133) were detected. At this time of year there was also an increase in the number of *G. duodenalis* cysts, which ranged between 140 and 11,840 cysts per liter (mean 1420). However, this increase was not statistically significant.

### 3.2. Molecular identification of parasites

PCR amplification of 18S SSU rRNA gene sequences was successful for samples containing *Cryptosporidium* spp.

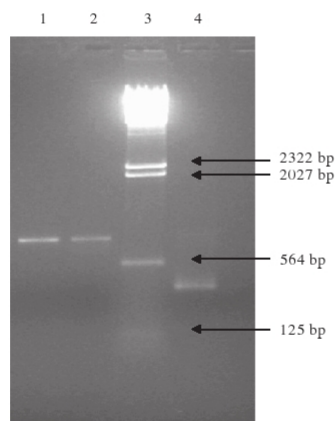


Fig. 3 – Typical agarose gel with the diagnostic profile for the 18S SSU rRNA gene from *Cryptosporidium* spp. (lanes 1–2) and the b-giardin gene from *G. duodenalis* (lane 4). DNA ladder from Lambda DNA-HindIII digest (lane 3).

oocysts. For *G. duodenalis* isolates, PCR amplification of the 753 bp fragment of the  $\beta$ -giardin gene was performed (Fig. 3). Samples that contained relatively high concentrations of nucleated (oo)cysts were selected. These samples were collected from the untreated wastewater (influent) and final effluent of the 12 WTPs during the spring and summer. At least two PCR products from each plant were sequenced.

As shown in Table 3, *C. hominis* was detected in the influent samples from 5 (41%) WTPs, and corresponded to the highest loading/population equivalent (Table 1); *C. parvum* and *C. andersoni* in four (33%) and three (25%) of the plants, respectively. For *G. duodenalis*, cysts of assemblage A-I and A-II were detected in two (16%) and three (25%) of the plants, respectively. Nevertheless, in another five samples (41%) two assemblages (A-I+E) were detected and in another two samples (16%), assemblages A-II+E were detected.

The results obtained after sequencing and/or by PCR-restriction fragment length polymorphism of the samples of (oo)cysts in the final effluent were similar to those identified in the influent. Nevertheless, in two WTPs (16%) *C. hominis* was identified in the final effluent and *C. parvum* in the influent; in another two WTPs (16%) *C. parvum* was the predominant species in the final effluent and *C. andersoni* was detected in the untreated wastewater (Table 3).

## 4. Discussion

*Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* enter the environment in feces from land-dwellers (both human and non-human hosts). Proper management, treatment and dispersal of human feces and animal manures are essential to maintain clean and safe drinking and recreational water. The enormity of the problem of keeping water clean and safe may seem overwhelming when the volume of feces that enters the environment is considered. The encysted forms of these pathogenic protozoa can be carried via wastewater run-off and rainfall-initiated run-off from urban, suburban and rural landscapes, into untreated waters used for agriculture, recreation and, in some locations, for drinking. Moreover, (oo)cysts can withstand normal water disinfection processes, and they have been found in significant quantities in the final effluents discharged from wastewater treatment plants (Cacciò et al., 2003; Fayer, 2004; Montemayor et al., 2005; Robertson et al., 2006; Rueker et al., 2007).

Table 3 – Identification of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *G. duodenalis* detected in the influent and effluent samples from wastewater treatment plants

Plant no.	Influent		Effluent	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>G. duodenalis</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>G. duodenalis</i>
1,7	<i>C. hominis</i>	A-II	<i>C. hominis</i>	A-II
2, 12	<i>C. parvum</i>	A-I+E	<i>C. hominis</i>	A-I+E
4,5,6	<i>C. hominis</i>	A-I+E	<i>C. hominis</i>	A-I+E
9	<i>C. andersoni</i>	A-II	<i>C. andersoni</i>	A-II
3,8	<i>C. andersoni</i>	A-II+E	<i>C. parvum</i>	A-II+E
10,11	<i>C. parvum</i>	A-I	<i>C. parvum</i>	A-I



This study examined the prevalence and concentrations of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in 12 wastewater treatment plants that discharge their effluents into a hydrographic basin that includes several recreational areas, river beaches and areas for pumping water to drinking water treatment plants. The aim of the study was to estimate the efficiency of treatment plants in removing these protozoans and to determine the species and genotype of these parasites, by means of a molecular assay, in an attempt to identify host sources of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* that contribute to contamination events and to evaluate their public health significance. Analysis of samples from 12 plants revealed that (oo)cysts were present in all influents and final effluent from WTPs (100%) throughout the year. The occurrence in untreated wastewater and treated final effluents samples are higher than reported in other countries (Bukhari et al., 1997; Cacciò et al., 2003; Robertson et al., 2006; Lim et al., 2007). The results for untreated wastewater demonstrate that *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* infections are widespread throughout Galicia, with giardiasis being more widespread and occurring at a higher intensity of infection than cryptosporidiosis. This is consistent with epidemiological data from other countries (Giovanni et al., 2006; Robertson et al., 2006; Lim et al., 2007).

The numbers of parasites in the influent of a WTP depend on the size of the community served, as well as the rate of infection within the population (Smith and Rose, 1990). The greater the size of population served, the higher the probability that the population will include an infected individual (Robertson et al., 2006; Lim et al., 2007). Nevertheless, in this study there was no direct relation between the population loading equivalent and the parasite concentrations in the WTPs. This may be due to the location of some of the WTPs as the hydrographic basin includes farming areas, especially cattle farms, and numerous pastures and crops to which fertilizers are applied during the year, as well as hunting areas, for both large and small game, and there may therefore be uncontrolled contamination via animals (especially wild animals), which are important sources of parasites in terms of wastewater contamination (Rueker et al., 2007). Wild and farmed animals were frequently observed during the study, residing in the natural vegetation buffer zones or directly within agricultural and urban settings. Moreover, in some small towns and villages (< 5000 inhabitants) industrial wastewater, often including animal excrements, are treated in the same WTPs where human sewage is treated, and obviously this practice favors the transmission of the zoonoses.

The determination of the species and genotype of these parasites by means of a molecular assay helps in the identification of host sources of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* that contribute to contamination. Nevertheless, caution is required when extrapolating molecular data from water samples to determine host sources of contamination. In studies that determine the host specificity of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis*, a direct association between the host being studied and the fecal material used for typing parasites has been observed (Perz and LeBlancq, 2001; Ryan et al., 2003; Zhou et al., 2004; Castro-Hermida et al., 2006a, b). This direct association does not exist for isolates from water

samples. Therefore, the host source can only be inferred from available host–parasite information and molecular phylogenetics, which can then be further supported by land use information. For example, the host source of *C. parvum* cannot be inferred from detection of a single occurrence; however, when the known host sources of *C. parvum* are considered along with land use analysis, the data suggest that cattle, deer and humans are the most probable sources within the watershed under study (Xiao et al., 2004).

*Cryptosporidium hominis* (formerly *C. parvum* genotype I or human, involved in the anthroponotic route of transmission) was detected in the influent from plants 1 and 7, as well as assemblage A of *G. duodenalis* (genotype A-II), responsible for anthroponotic transmission of infection, suggesting that the majority of (oo)cysts in the untreated wastewater originated from human infections. Although there is no available data on the presence of cases of human cryptosporidiosis and giardiasis in the area of influence of these two WTPs, extrapolation from the analytical data, combined with WTP technical data, enable estimation of the numbers of infected individuals, assuming that (oo)cysts in the influent originated from relatively heavy, and therefore symptomatic, infections. Obviously, (oo)cysts in untreated wastewater will not only be derived from symptomatic persons but also from asymptomatic individuals excreting lower number of (oo)cysts; this is probably particularly so for *G. duodenalis*, which is recognized as a cause of chronic infections. In the other 10 WTPs, the existence of a single definite source of infection cannot be identified. Thus in plants 4, 5 and 6, *C. hominis* (anthroponotic route of transmission) was detected, but not assemblage A of *G. duodenalis* (genotype A-I), which infects humans, domestic ruminants, dogs, cats, beavers, rats and other animals or assemblage E *G. duodenalis* responsible for infections in domestic ruminants, cats and rats. In such cases, in which species or genotypes responsible for anthroponotic and zoonotic routes of transmission are detected it is possible that there is a higher predominance of species of animal or of human origin in specific areas. In plants 9, 3 and 8 where *C. andersoni* (which infects the abomasum of juvenile and mature cattle and has been identified as a cause of reduced milk production but is not known to affect animals other than cattle (Anderson, 1998)) was detected along with assemblage A of *G. duodenalis* (genotype A-II) (responsible for anthroponotic transmission) and assemblage E of *G. duodenalis* (plants 3 and 8), it is possible that there is a higher proportion of bovine than human cryptosporidiosis in the area of influence of the plant, and a higher proportion of human giardiasis than animal giardiasis. This information was obtained by examination of the influent, which provides a more representative indication of endemic infection than epidemiological data, as it takes into account all of the asymptomatic carriers and misdiagnosed cases that usually escape detection. Nevertheless, and as previously mentioned, in some cases it is not possible to detect the host source of contamination specifically. For example, in plants 2, 10, 11 and 12 we detected *C. parvum* and assemblage A of *G. duodenalis* (genotype A-I) responsible for zoonotic transmissions and assemblage E of *G. duodenalis* (plants 2 and 12), which principally infect domestic ruminants. It may therefore be speculated that the random distribution of (oo)cysts may

result in one isolate predominating on one occasion and another isolate predominating on another. These results suggest that isolate heterogeneity within a sample should not be excluded unless the PCR analysis is repeated, either with the same or different primer sets.

The presence of high mean concentrations of *Cryptosporidium* spp. oocysts (2–390 oocysts per liter) and *G. duodenalis* cysts (79–2469 cysts per liter), most of them DAPI+ (87%), in the final effluent is of concern to public health because the effluent is discharged directly into the river and in some cases the treated water is used for land restoration and agriculture irrigation, thereby leading to environmental contamination with these pathogenic protozoans. This poses health risks when the river water is used for household consumption and use in communities downstream from the point of discharge. Furthermore, the hydrographic basin not only includes recreational areas, river beaches and pumping areas for drinking water treatment plants, but the main river also flows into an estuary where bivalve molluscs are cultured for human consumption. A high prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in bivalve molluscs from this shellfish-farming area has been reported (Gómez-Couso et al., 2005, 2006). As regards the determination of species and genotypes of these parasites by means of a molecular assay in the effluent, the species detected were similar to those detected in the influent, except in plants 2 and 12, in which *C. parvum* was detected in the untreated wastewater and *C. hominis* in the final effluent. This may be attributed to settlement of (oo)cysts, an effect previously shown to reduce rates of incidence (Brookes et al., 2005). The data reinforce the complexity associated with contamination events within a plant and the challenges associated with capturing and accounting for these dynamic spatial and temporal variations by grab sampling methods. Another possible factor is the transportation of (oo)cysts in overland flow within a WTP. The sediment and (oo)cysts are subjected to deposition when present in overland flow or low flow, as in the tanks involved in primary and secondary treatment processes. The low settling velocities indicate that (oo)cysts will settle out of suspension very slowly. In cases where (oo)cysts are attached to particles, settling of (oo)cysts will be linked to the settling velocity of the particles (Searcy et al., 2005; Dai and Boll, 2006). It is thus possible that once the aeration systems in the secondary treatment begin to operate, the (oo)cysts will be resuspended, thereby favoring their exit in the effluent, and therefore the presence of one species or another may depend on the higher concentration of a species or genotype, or may simply be a random process. Moreover, these reasons could explain that in some WTPs there was more pathogens leaving the station after the treatment than coming to that station.

Although *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* were found in all of the wastewater samples from the 12 treatment plants throughout the year, the highest numbers of (oo)cysts were found in the spring and summer. Although similar seasonal patterns have been reported by some authors (Isaac-Renton et al., 1996; Cacciò et al., 2003; Montemayor et al., 2005; Carmena et al., 2007), they have not been confirmed by others (Hashimoto et al., 2001; Robertson and Gjerde, 2001) and thus it is not clear whether or not seasonality is a general feature of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* contamination.

In the present study, the increase in parasitic forms detected in spring and summer may be due to agricultural activities (fertilization of pastures with animal manure, lambing, cattle farming, calving, and extensive pasturing of cattle, especially adult cows and cattle). At these times of year many people visit river beaches and recreational areas and take part in aquatic sports and fishing. There are touristic areas all along the hydrographic basin, and the WTPs that serve these areas are not large enough to treat the amount of sewage generated, especially in summer, and therefore the treatment of the wastewater is not adequate.

The type of treatment process plays an important role in determining whether the numbers of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* parasites are reduced. In this study, we showed that the average removal efficiencies at these 12 wastewater treatment plants, which have both primary and secondary treatment processes, ranged between 16% and 86% for *Cryptosporidium* spp. and between 2% and 90% for *G. duodenalis*. These rates of efficiency are consistent with those reported for other treatment plants that use similar processes (Cacciò et al., 2003; Montemayor et al., 2005; Robertson et al., 2006; Lim et al., 2007). Nevertheless, such estimates should be treated with caution. In this study, there were no significant differences in the concentrations of (oo)cysts per liter of effluent or influent at the different times of year. Moreover, as the estimated parasite loads at these WTPs were considerable, particularly for *G. duodenalis*, parasite discharge in the effluent may also be considerable, and thereby represent a risk to human and animal health.

Different studies involving WTPs where only primary treatments are carried out or where each treatment was examined individually revealed generally low removal efficiencies in the primary steps (Casson et al., 1990; Robertson et al., 2000). Primary treatment involves removal of materials, including fats, oils, sand, gravel and rocks, which are easily collected and disposed of. This step is done entirely with machinery. In this study, plants 1, 5, 7 and 8 apply a sedimentation stage in which the sewage is allowed to pass slowly through large tanks, known as “primary clarifiers” or “primary sedimentation tanks”. The tanks are large enough for fecal solids to settle, and for material such as grease and oils to rise to the surface and be skimmed off. The main purpose of the primary stage is to produce a generally homogeneous liquid that can then be treated biologically, and a sludge that can be treated or processed separately. In Galicia, some WTPs use primary treatment processes only, and it should be assumed that in such WTP, removal of parasites from the sewage influent is minimal because this is not the aim of the primary treatment. Most research dealing with parasite removal in WTPs have investigated plants with different secondary or tertiary treatments and have reported removal efficiencies of around 90% for *G. duodenalis* cysts (Cacciò et al., 2003; Robertson et al., 2006; Lim et al., 2007), with removal of *Cryptosporidium* spp. usually lower and more variable. In the present study, the percentage removal efficiencies were highest in plant 7 and ranged between 83% and 90% for *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis*, respectively; perhaps the use of activated sludge, sedimentation and ultraviolet disinfection resulted in a greater reduction in numbers of (oo)cysts than achieved with other treatments.



(oxidation with O<sub>2</sub>, oxidizing beds or biological filters). Nevertheless, in a study of the rate of removal of *C. parvum* oocysts from sewage subjected to laboratory simulation of activated sludge treatment (80–84%), it was demonstrated that infection developed in mice inoculated with the treated sewage, indicating that the remaining oocysts maintained their infectivity and were present in sufficient numbers for infection to occur (Villacorta-Martínez de Maturana et al., 1992). However, in a recent study Graczyk et al. (2007) indicated that sludge activation process is an effective treatment that significantly decreases the number of infectious human intestinal protozoan pathogens. Further research is therefore required to determine the most effective treatment for reducing the concentrations of (oo)cysts in the effluent. The present results may be biased by several factors, including the underestimation of (oo)cyst concentrations due to the efficiency of the techniques, the limited number of samples examined, and the different volume of water treated in each plant. For some WTPs (1, 3, 8 and 12), the concentration of (oo)cysts per liter of effluent was greater than the concentration per liter of influent collected on the same day, which may be due to some alteration in the treatment processes.

## 5. Conclusions

The present study therefore demonstrates the importance of the parasitological control of effluents from WTPs and the need for regulations to establish acceptable concentrations of (oo)cysts based on the posterior use of wastewaters, i.e., whether recycled for agricultural purposes or for industry. Moreover, it is important that wastewater treatment authorities rethink the relevance of levels of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* contamination in wastewater, and that they develop appropriate countermeasures.

## Acknowledgments

The present study was financially supported by the Xunta de Galicia, through the Consellería de Innovación e Industria (PGDIT05RAG50306PR), Ministerio de Educación y Ciencia, by the Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias (RTA2006-00007-00-00) and by the European Social Fund.

## REFERENCES

- Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14, 447–475.
- Anderson, M.A., Stewart, M.H., Yates, M.V., Gerba, C.P., 1998. Modeling the impact of body-contact recreation on pathogen concentrations in a source drinking water reservoir. Water Res. 32, 3293–3306.
- Brookes, J.D., Antenucci, J., Hipsey, M., Burch, M.D., Ashbolt, N.J., Ferguson, C., 2004. Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs. Environ. Int. 30, 741–759.
- Brookes, J.D., Hipsey, M., Burch, M.D., Regel, R.H., Linden, L.G., Ferguson, C., 2005. Relative value of surrogate indicators for detecting pathogens in lakes and reservoirs. Environ. Sci. Technol. 39, 8614–8621.
- Bukhari, Z., Smith, H.V., Sykes, N., Humphreys, S.W., Paton, C.A., Girdwood, R.W.A., Fricker, C.R., 1997. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England. Water Sci. Technol. 35, 385–390.
- Cacciò, S.M., De Giacomo, M., Aulicino, F.A., Pozio, E., 2003. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3393–3398.
- Cacciò, S.M., De Giacomo, M., Pozio, E., 2002. Sequence analysis of the  $\beta$ -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int. J. Parasitol. 32, 1023–1030.
- Carmena, D., Aguinalde, X., Zigorraga, C., Fernández-Crespo, J.C., Ocio, J.A., 2007. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. J. Appl. Microbiol. 102, 619–629.
- Casson, L.W., Sorber, C.A., Sykora, J.L., Gavaghan, P.D., Shapiro, M.A., Jakubowski, W., 1990. *Giardia* in wastewater—effect of treatment. Water Pollut. Control Fed. Res. J. 62, 670–675.
- Castro-Hermida, J.A., Delafosse, A., Pors, I., Ares-Mazás, E., Chartier, C., 2005. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. Vet. Rec. 157, 623.
- Castro-Hermida, J.A., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia da Costa, J.M., Mezo, M., 2006a. Prevalence and preliminary genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from asymptomatic heifers in Galicia (NW, Spain). J. Eukariot. Microbiol. 53, S22–S23.
- Castro-Hermida, J.A., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia da Costa, J.M., Mezo, M., 2006b. Prevalence and preliminary genetic analysis of *Giardia* isolated from adult sheep in Galicia (NW, Spain). J. Eukariot. Microbiol. 53, S172–S173.
- Castro-Hermida, J.A., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia da Costa, J.M., Rumbo-Lorenzo, C., Mezo, M., 2007a. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. Parasitol. Res. 101, 1443–1448.
- Castro-Hermida, J.A., González-Warleta, M., Mezo, M., 2007b. Natural infection by *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in sheep and goats in Galicia (NW Spain). Small Rumin. Res. 72, 96–100.
- Chappell, C.L., Okhuysen, P.C., Langer-Curry, R., Widmer, G., Akiyoshi, D.E., Tanriverdi, S., Tzipori, S., 2006. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. Am. J. Trop. Med. Hyg. 75, 851–857.
- Chauret, C., Springthorpe, S., Sattar, S., 1999. Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. Can. J. Microbiol. 45, 257–262.
- Center of Disease Control and Prevention, 2006. Fact sheet—crypto-protection against recreational water illness <<http://www.cdc.gov/healthyswimming/cryptofacts.htm>> [online].
- Craun, G.F., Calderon, R.L., Craun, M.F., 2005. Outbreaks associated with recreational water in United States. Int. J. Environ. Health Res. 15, 243–262.
- Dai, X., Boll, J., 2006. Settling velocity of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. Water Res. 40, 1321–1325.
- Directive 92/43/EEC., 1992. Council of the European Communities. Directive on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. J. Off. Union Eur. L 206, 0007–0050.
- DuPont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B., Jakubowski, W., 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. N. Engl. J. Med. 332, 855–859.
- Enriquez, C., Nwachuku, N., Gerba, C.P., 2001. Direct exposure to animal enteric pathogens. Rev. Environ. Health 16, 117–131.

- Fayer, R., 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.* 126, 37–56.
- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30, 1305–1322.
- Giangaspero, A., Berrilli, F., Brandonisio, O., 2007. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. *Parasitol. Res.* 101, 1169–1182.
- Giovanni, G.D., Betancourt, W.Q., Hernandez, J., Assadian, N.W., Flores Margez, J.P., Jaramillo Lopez, E., 2006. Investigation of potential zoonanthroponotic transmission of cryptosporidiosis and giardiasis through agricultural use of reclaimed wastewater. *Int. J. Environ. Health Res.* 16, 405–418.
- Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Castro-Hermida, J.A., Ares-Mazás, E., 2005. *Giardia* in shellfish-farming areas: detection in mussels, river water and waste waters. *Vet. Parasitol.* 133, 13–18.
- Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Castro-Hermida, J.A., Ares-Mazás, E., 2006. *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. *J. Food Protect.* 69, 185–190.
- Graczyk, T.K., Lucy, F.E., Tamang, L., Mirafior, A., 2007. Human enteropathogen load in activated sewage sludge and corresponding sewage end products. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2013–2015.
- Hancock, D., Besser, T., Lejeune, J., Davis, M., Rice, D., 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 71–78.
- Hashimoto, A., Hirata, T., Kunikane, S., 2001. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in a conventional water purification plant. *Water Sci. Technol.* 43, 89–92.
- Indest, K., 2003. Interim guidance on assessing the risk posed by pathogens associated with dredged material (no. ERDC/TN EEDP-01-49).
- Isaac-Renton, J., Moorehead, W., Ross, A., 1996. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two community drinking water supplies: cysts levels, parasite viability, and health impact. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 47–54.
- Karanis, P., Papadopoulou, C., Kimua, A., Economou, E., Kourenti, C., Sakkas, H., 2002. *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural, drinking and recreational water of northwestern Greece. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 30, 49–58.
- Lim, Y.A.L., Hafiz, W., Nissapatorn, V., 2007. Reduction of *Cryptosporidium* and *Giardia* by sewage treatment processes. *Trop. Biomed.* 24, 95–104.
- McQuin, R.M., Clancy, J.L., 2003. Modifications to United States environmental protection agency methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 267–274.
- Meyer, E.A., Jarroll, E.J., 1980. Giardiasis. *Am. J. Epidemiol.* 111, 1–12.
- Montemayor, M., Valero, F., Cofre, J., Lucena, F., 2005. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1455–1462.
- Perz, J.F., LeBlancq, S.M., 2001. *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York State. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1154–1162.
- Quintero-Betancourt, W., Gennaccaro, A.L., Scott, T.M., Rose, J.B., 2003. Assessment of methods for detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in reclaimed effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5380–5388.
- Reynolds, K.A., Mena, K.D., Gerba, C.P., 2008. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 192, 117–158.
- Robertson, L.J., Gjerde, B.K., 2001. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw waters in Norway. *Scand. J. Public Health* 29, 200–207.
- Robertson, L.J., Paton, C.A., Campbell, A.T., Smith, P.G., Jackson, M.H., Gilmour, R.A., Black, S.E., Stevenson, D.A., Smith, H.V., 2000. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. *Water Res.* 34, 2310–2322.
- Robertson, L.J., Hermansen, L., Gjerde, B.K., 2006. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5297–5303.
- Rueker, N.J., Braithwaite, S.L., Topp, E., Edge, T., Lapen, D.R., Wilkes, G., Robertson, W., Medeiros, D., Sensen, C.W., Neumann, N.F., 2007. Tracking host sources of *Cryptosporidium* spp. in raw water for improved health risk assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3945–3957.
- Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A.A., Pavlasek, I., 2003. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4302–4307.
- Searcy, K.E., Packman, A.I., Atwill, E.R., Harter, T., 2005. Association of *Cryptosporidium parvum* with suspended particles: impact on oocyst sedimentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1072–1078.
- Slifko, T.R., Smith, H.V., Rose, J.B., 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int. J. Parasitol.* 30, 1379–1393.
- Smith, H.V., Rose, J.B., 1990. Waterborne cryptosporidiosis. *Parasitol. Today* 6, 8–12.
- Smith, H.V., Cacciò, S.M., Cook, N., Nichols, R.A.B., Tait, A., 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet. Parasitol.* 149, 29–40.
- Sterling, C.R., 1990. Waterborne cryptosporidiosis. In: Dubey, J.P., Speer, C.A., Fayer, R. (Eds.), *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 51–58.
- Sunderland, D., Graczyk, T.K., Tamang, L., Breyse, P.N., 2007. Impact of bathers on levels of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts in recreational beach waters. *Water Res.* 41, 3483–3489.
- Tamburrini, A., Pozio, E., 1999. Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.* 29, 711–715.
- Thompson, R.C.A., 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.* 30, 1259–1267.
- US Environmental Protection Agency, 2001. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. EPA 821-R-01-025. Office of Ground Water and Drinking Water Technical Support Center, US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Villacorta-Martínez de Maturana, I., Ares-Mazás, M.E., Durán-Oreiro, D., Lorenzo-Lorenzo, M.J., 1992. Efficacy of activated sludge in removing *Cryptosporidium parvum* oocysts from sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3514–3516.
- World Health Organization, 2002. Guidelines for Drinking Water Quality; Addendum—Microbial Agents in Drinking Water, second ed. WHO, Geneva, Switzerland.
- Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C.A., Fayer, R., Lal, A., 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3386–3391.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J., 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 72–97.
- Yoder, J., Blackburn, B., Gunther, G., Hill, V., Levy, D., Chen, N., 2004. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water—United States, 2001–2002. Washington, DC.
- Zhou, L., Fayer, R., Trout, J.M., Ryan, U.M., Schaefer III, F.W., Xiao, L., 2004. Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7574–7577.





**Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water.**

Castro-Hermida, J.A.; [García-Presedo, I.](#); Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M.

***Science of the Total Environment*, 405: 45-53. 2008.**



El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *G. duodenalis* en 16 estaciones de tratamiento de agua potable ubicadas en una cuenca hidrográfica. El estudio se llevó a cabo durante la primavera, verano, otoño e invierno de 2007. En cada estación del año y en cada una de las ETAPs, se filtró agua en la zona de captación (50-100 l) y en el efluente (100 l). Al considerar los afluentes de las 16 ETAPs, los valores obtenidos para *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* oscilaron entre 0-10,5 OPL y 1-12,8 QPL, respectivamente. En los efluentes, los resultados obtenidos para *Cryptosporidium* spp. estuvieron comprendidos entre 0-3 OPL mientras que para *G. duodenalis* estos valores oscilaron entre 0,5-4 QPL. Para ambos enteropatógenos, el mayor número de formas infectantes se identificó durante la primavera y el verano. En las muestras de agua, se detectaron *C. andersoni*, *C. hominis*, *C. parvum* y los genotipos A-I, A-II y E de *G. duodenalis*.



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)[www.elsevier.com/locate/scitotenv](http://www.elsevier.com/locate/scitotenv)

## Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water

José Antonio Castro-Hermida<sup>a,\*</sup>, Ignacio García-Presedo<sup>a</sup>, André Almeida<sup>b</sup>,  
Marta González-Warleta<sup>a</sup>, José Manuel Correia Da Costa<sup>b</sup>, Mercedes Mezo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo-Xunta de Galicia. Carretera AC-542 de Betanzos a Mesón do Vento, Km 7,5. CP 15318. Abegondo (A Coruña), Spain

<sup>b</sup>Centro de Imunología e Biología Parasitaria-INSA, Porto, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 April 2008

Received in revised form 16 June 2008

Accepted 24 June 2008

Available online 6 August 2008

#### Keywords:

*Cryptosporidium* spp.

*Giardia duodenalis*

Drinking water

Water quality

Public health

Surface water

### ABSTRACT

To evaluate the presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in the influent and final effluent of sixteen drinking water treatment plants located in a hydrographic basin in Galicia (NW Spain) – in which the principal river is recognised as a Site of Community Importance (SCI) – estimate the efficiency of treatment plants in removing these protozoans and determine the species and genotypes of the parasites by means of a molecular assay. All plant samples of influent and final effluent (50–100 l) were examined in the spring, summer, autumn and winter of 2007. A total of 128 samples were analysed by method 1623, developed by US Environmental Protection Agency for isolation and detection of both parasites. To identify the genotypes present the following genes were amplified and sequenced: 18S SSU rRNA (*Cryptosporidium* spp.) and b-giardina (*G. duodenalis*). The mean concentrations of parasites in the influent were 0.0–10.5 *Cryptosporidium* spp. oocysts per litre and 1.0–12.8 of *G. duodenalis* cysts per litre. In the final treated effluent, the mean concentration of parasites ranged from 0.0–3.0 oocysts per litre and 0.5–4.0 cysts per litre. The distribution of results by season revealed that in all plants, the highest numbers of (oo)cysts were recorded in spring and summer. *Cryptosporidium parvum*, *C. andersoni*, *C. hominis* and assemblages A-I, A-II, E of *G. duodenalis* were detected. *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* were consistently found at high concentrations in drinking water destined for human and animal consumption in the hydrographic basin under study, in Galicia (NW Spain). It is important that drinking water treatment authorities rethink the relevance of contamination levels of both parasites in drinking water and develop adequate countermeasures.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* are common food and waterborne protozoa that affect humans and a wide range of domestic and wild animals (Fayer, 2004). These parasites are among the major causal agents of diarrhoeal disease in humans and animals worldwide, and can even potentially shorten the life span of immunocompromised hosts. Trans-

mission is sustained by both a zoonotic and an anthroponotic cycle (Fayer et al., 2000; Slifko et al., 2000; Thompson, 2000). The infected hosts, whether humans or animals, shed very large numbers of transmissible stages – oocysts or cysts – in their faeces, thereby increasing environmental contamination. Moreover, the (oo)cysts are very resistant to harsh environmental conditions and disinfectants, at the concentrations commonly used in water treatment plants to reduce

\* Corresponding author. Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo-Xunta de Galicia. Carretera AC-542 de Betanzos a Mesón do Vento, Km 7,5. CP 15318. Abegondo (A Coruña), Spain.  
E-mail address: [jose.antonio.castro.hermida@xunta.es](mailto:jose.antonio.castro.hermida@xunta.es) (J.A. Castro-Hermida).

bacterial contamination (Karanis et al., 2002; WHO, 2002; Center of Disease Control and prevention, 2006), although it has been shown that *G. duodenalis* cysts are less resistant than *Cryptosporidium* spp. oocysts to higher concentrations of chlorine and ozone (Sterling, 1990). Drinking water resources become contaminated when faeces containing the parasites are deposited or flushed into water (Smith et al., 2007; Reynolds et al., 2008). Drinking water, even from well-managed treatment plants, can cause illness when it contains sufficient numbers of viable and infective (oo)cysts to *G. duodenalis* cysts have been shown to survive in water for up to 2 months at temperatures as low as 8 °C (Meyer and Jarroll, 1980), and *Cryptosporidium* spp. oocysts can survive for up to 1 year at 4 °C in artificial seawater (Tamburrini and Pozio, 1999). The number of parasites required to induce infection is relatively small. In fact, the infectious dose (ID50) has been estimated to be as low as 83–123 oocysts for *Cryptosporidium* spp. (DuPont et al., 1995; Chappell et al., 2006) and 19–50 cysts for *G. duodenalis* cysts (Adam, 2001).

Most drinking water must be pumped from its source or directed into pipes or holding tanks typically located in the headwaters of river systems. Other sources of drinking water include reservoirs, rivers, canals and/or low land reservoirs. However, (oo)cysts can enter surface waters from discharges from wastewater treatment plants, biosolids, urban runoff, or agricultural runoff, thereby causing infections (Cacciò et al., 2003; Brookes et al., 2004; Craun et al., 2005; Montemayor et al., 2005). Moreover, infected animals can also act as reservoirs of pathogens, and even though they show no obvious signs of disease or clinical symptoms (Castro-Hermida et al., 2005, 2007a,b), they may ultimately spread the pathogens to human food (Hancock et al., 2001) or directly to humans (Enriquez et al., 2001). In many countries, there are no requirements for testing surface waters for the presence of these parasites, although it has been shown through outbreaks that the pathogens can be shed into recreational and drinking water (Karanis et al., 2006; Giangaspero et al., 2007; Sunderland et al., 2007).

The present study involved the analysis of samples of influent and effluent from sixteen drinking water treatment plants distributed in the Tambre river hydrographic basin (1530 km<sup>2</sup> in surface; 42°46' to 43°10' N, 8° 00' to 9° 03' W). This basin is one of the most important in this study region (Galicia, NW Spain) and the Tambre river was declared a Site of Community Importance (SCI), by the European Commission Habitats Directive (92/43/EEC) in 1992. Nevertheless, there is significant farming activity in this hydrographical basin, predominantly cattle farming (livestock census: 69,803), the runoff from which may be a potential source of contamination in surface water. Moreover, it is a supply of water destined for human consumption, providing drinking water to approximately 200,000 people. These drinking water sources are generally open to varied recreational uses, including swimming, especially during the spring and summer. The water is treated in conventional large and medium-size water plants and treatment includes coagulation, flocculation, and clarification through sedimentation, filtration and disinfection processes. However, some small communities (approximately 6195 people) use surface water supplies with minimal treatment, usually only chlorination. The specific aims of the present study were to evaluate the prevalence and concentra-

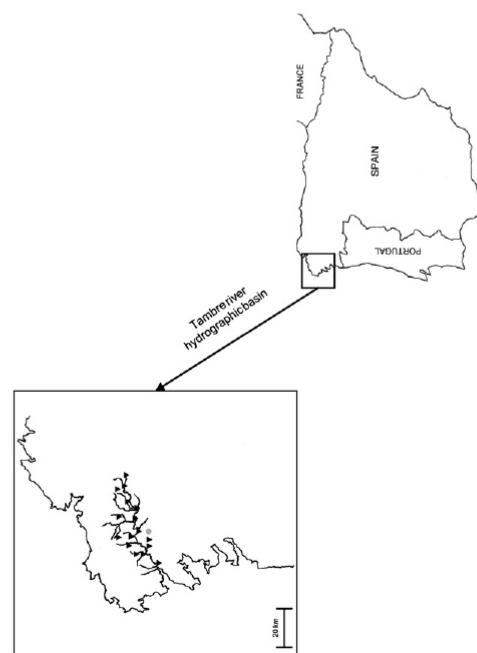
tions of these parasites in sixteen drinking water treatment plants, to estimate the efficiency of treatment plants in removing these protozoans and to determine the species and genotype of these parasites by means of a molecular assay.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample collection

Two samples (50 to 100 l), one of untreated water (influent) and other of treated water (final effluent) were collected in 16 drinking water treatment plants (Fig. 1) during the spring, summer, autumn and winter of 2007 (32 samples per season). The holding times of each step in the process were taken into consideration when collecting the samples, so that comparable water samples were obtained at these points in the treatment process.

Samples were taken immediately to the laboratory and processed with the Filta-Max Automatic System (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA). Filtration cartridges were set up according to the manufacturer's instructions, and all samples were filtered at recommended flow rates. The filter elution and final concentration of the sample were performed with the same equipment, and by following the manufacturer's instructions. Briefly, this involved placing a membrane



**Fig. 1 – Geographic location of the drinking water treatment plants (○) in the Tambre River hydrographic basin (Galicia; NW Spain). All of them were sampled in this study. Santiago de Compostela (●), with 93,458 inhabitants, is the main city in this area.**



filter (3- $\mu$ m pore size; polysulphone) in the base of the sample concentrator, inserting the filter module into the apparatus, adding 600 ml of phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.01% Tween 20 (PBST) to the reservoir, and unscrewing the filter housing to allow expansion of the foam pads. The foam pads were washed by pumping the plunger and then transferring the PBST elution volume into the magnetic particle concentrator and filtering the entire volume to approximately 20 to 25 ml, under vacuum. The process was repeated with a second volume (600 ml) of PBST and the resulting concentrate was pooled with the first concentrate and then filtered under vacuum to produce a final volume of around 20 ml. This was then transferred into a 50-ml centrifuge tube. The filter membrane was transferred to a small sealable plastic bag, and 8–10 ml of PBST was added, the membrane was kneaded manually, and the spent wash volume was pooled with the primary eluate. The membrane washing procedure was repeated twice. The sample was resuspended to 50 ml with PBST and centrifuged at 1500 $\times g$  for 5 min. The supernatant was aspirated to 10 ml, and the resuspended pellet was transferred to a Leighton tube and subjected to Immunomagnetic Separation technology (IMS).

## 2.2. Sample analysis for parasite occurrence

The IMS procedure was performed as described in US EPA method 1623 (USEPA, 2001). Briefly, each 10-ml sample concentrate was added to a Leighton tube containing 1 ml of 10 $\times$  SL buffer A and 1 ml of 10 $\times$  SL buffer B (Dynabeads® GC-Combo, Invitrogen Dynal, A.S., Oslo, Norway). One hundred microlitres of *Cryptosporidium* and *Giardia* IMS beads were added to each tube, and samples were incubated for 1 h at room temperature with constant rotation. The Leighton tubes were then placed in a magnetic particle concentrator and gently rocked for 2 min through an angle of 90°. The supernatant was decanted; the tubes were removed from the magnetic particle concentrator, and 1 ml of 1 $\times$  SL buffer A was added to each. The tubes were gently rocked to resuspend the bead-(oo)cyst complexes; the suspension was transferred to 1.5 ml polypropylene tubes, with a Pasteur pipette, and these tubes were placed in a second magnetic particle concentrator and rocked for 1 min. Supernatants were aspirated, the magnet was removed, and 100  $\mu$ l of 0.1 N HCl was added to each sample, which was vortexed for a minimum of 10 s. Samples were allowed to stand for 10 min in an upright position, then vortexed for a further 10 s, and magnets were inserted. The tubes were left undisturbed for 2 min. The beads were collected at the back of the tube and the 100  $\mu$ l acidified suspension was divided into two parts of 50  $\mu$ l. One part was transferred to a well slide containing 10  $\mu$ l of 1.0 N NaOH. The remaining volume (50  $\mu$ l) was maintained at –20 °C until use for DNA extraction.

## 2.3. Staining procedure for recovered (oo)cysts

The samples were dried, fixed in acetone, and 50  $\mu$ l of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-*Cryptosporidium* sp. and anti-*Giardia* sp. MAbs (Aqua-Glo; Waterborne Inc., New Orleans, La) were placed in each well. The slides were placed in a humidified chamber, incubated (37 °C for 45 min), and excess

FITC-MAb was aspirated. Any remaining FITC-MAb was removed by adding 50  $\mu$ l of PBS to each well, leaving the slides for 5 min, and aspirating the excess PBS. A 50  $\mu$ l aliquot of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution (0.4  $\mu$ g/ml in PBS) was introduced into each well. The slides were left at room temperature for 15 min, and excess DAPI solution was removed by washing the slides twice in PBS and once in distilled water. The slides were placed in the dark until dry, then a 10  $\mu$ l aliquot of mounting medium (2% diazabicyclooctane [DABCO] in 60% glycerol 40% PBS) was placed in each well, and slides were sealed for subsequent examination under epifluorescence optics (Nikon Eclipse 90i microscope, Nikon Corporation, Tokyo, Japan), as described in method 1623 (USEPA, 2001). *Cryptosporidium* sp. oocysts were identified on the basis of their size, shape, and the presence of a suture on the oocyst wall, at a magnification of 400 $\times$ . *Giardia* sp. cysts were identified by their size, shape and the pattern and intensity of immunofluorescence assay staining (i.e., bright green fluorescence of the cyst wall). Parasites in each slide well were enumerated, and the mean numbers were used to extrapolate to concentrations of parasites per litre of sample. Positive and negative controls, as recommended in the Method 1623, were used. The (oo)cysts used as positive controls were those provided with the MAbs (Aqua-Glo; Waterborne Inc., New Orleans, La). Oocyst concentrations were calculated taking into account the mean recovery percentages of *Cryptosporidium* spp. oocysts (50%  $\pm$  13%) and *G. duodenalis* cysts (41%  $\pm$  9%) determinate by McCuin and Clancy (2003) using Filt-Max system and IMS. Important variations of the turbidity and temperature of water samples that could modify the efficiency of the filters were not observed. In each season, inter-assay test was carried out, according to method 1623, in order to confirm the good performance of the detection system.

## 2.4. DNA extraction

Samples containing relatively high concentrations of nucleated (oo)cysts were selected for DNA extraction from the frozen samples as described in Section 2.2. The parasites were isolated by IMS (Dynabeads® GC-Combo, Invitrogen Dynal, A.S., Oslo, Norway), following the manufacturer's instructions, but the beads were washed several times before the beads and parasites were dissociated and the isolated parasites were resuspended in Tris-EDTA buffer. DNA was isolated with a QIAamp® DNA Mini kit (QIAGEN GmbH, Germany), according to the manufacturer's instructions.

## 2.5. Gene amplification and sequencing

*Cryptosporidium* species and genotypes were determined by a technique based on a two-step nested PCR protocol and sequencing of PCR products. An 830 bp fragment of the 18S SSU rRNA gene was amplified with primers 5'-TTCTAGAGCT-AATACATGCG-3' and 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAG GA-3' for primary PCR and 5'-GGAAGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' and 5'-AAGGAGTAA GGAACAACCTCC A-3' for secondary PCR (Xiao et al., 1999). The primary PCR mixture contained 1 $\times$ PCR buffer, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M (each) deoxynucleoside triphosphate, 100 nM (each) primer, 2 units of Taq polymerase (New England BioLabs), and 10  $\mu$ l of purified DNA in a final volume of 50  $\mu$ l. Each of 45 cycles consisted of 94 °C for 40 s, 55 °C for 40 s,



**Table 1 – Arithmetic mean, maximum (max) and minimum (min) numbers of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *G. duodenalis* cysts in the influent and effluent samples from drinking water treatment plants over a period of 12 months**

Plant <sup>a</sup>	Treatment	Oocysts per litre							Cysts per litre						
		Influent			Effluent			Removal (Log)	Influent			Effluent			Removal (Log)
		Mean	Max	Min	Mean	Max	Min		Mean	Max	Min	Mean	Max	Min	
1	T1	7.0	26	0	0.5	2	0	0.73	6.0	17	0	2.5	10	0	0.30
2		2.5	6	0	1.5	4	0	0.15	4.8	7	2	2.3	5	0	0.25
3		1.0	2	0	0.5	2	0	0.12	1.8	5	0	1.0	2	0	0.14
4	T2	0.5	2	0	1.0	2	0	NR	4.5	12	2	4.0	12	0	0.04
5		0.0	0	0	1.0	2	0	NR	1.0	2	0	1.8	5	0	NR
6		0.5	2	0	3.0	8	0	NR	5.5	15	0	1.5	2	0	0.41
7	T3	0.5	2	0	1.0	2	0	NR	6.8	17	0	2.3	5	0	0.38
8		2.5	6	0	3.0	2	0	NR	2.3	5	0	2.8	7	0	NR
9		1.0	4	0	1.0	2	0	0.00	2.3	7	0	2.0	2	2	0.03
10	T3	2.0	6	0	1.0	4	0	0.18	3.5	12	0	0.5	2	0	0.48
11		0.5	2	0	0.0	0	0	0.18	10.5	27	0	1.0	2	0	0.76
12		0.5	2	0	0.0	0	0	0.18	2.3	5	0	0.5	2	0	0.34
13	T3	2.0	6	0	0.5	2	0	0.30	3.0	10	0	1.0	2	0	0.30
14		10.5	36	0	0.0	0	0	1.04	4.8	17	0	1.3	5	0	0.41
15		3.5	12	0	0.5	2	0	0.48	12.0	34	2	2.8	5	2	0.54
16		0.5	2	0	0.0	0	0	0.18	12.8	49	2	0.5	2	0	0.96

T1 Water facilities that only include sedimentation and chlorination.

T2 Small water treatment plants that include rapid filtration and/or disinfection processes.

T3 Conventional water treatment facilities that include coagulation, flocculation, sedimentation, filtration and disinfection.

<sup>a</sup> Eight samples were collected in each plant: one from influent and another from the effluent in each season.

and 72 °C for 1 min 30 s after an initial hot start at 94 °C for 4 min and ending with 72 °C for 7 min. A secondary PCR product was then amplified from 5 µl of the primary PCR. The secondary PCR mixture was identical except that the MgCl<sub>2</sub> concentration was 3 mM. Each of 45 cycles consisted of 94 °C for 40 s, 55 °C for 40 s, and 72 °C for 1 min after an initial hot start at 94 °C for 4 min and ending with 72 °C for 7 min.

For molecular typing of *G. duodenalis* a semi-nested PCR and partial sequencing of the β-giardin locus were performed (Cacciò et al., 2002). In the primary reaction, a 753 bp fragment was amplified with the forward primer G7 5'-AAGCCGACGACCT-CACCCGAGTGC-3', 3' and the reverse primer G759 5'-GAGGC-CGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'. In the sequential semi-nested PCR reaction, a 384 bp fragment was amplified with the forward inner primer G376 5'-CATAACGACGCCATCGCGCTCTCAGGAA-3' and the reverse primer G759, as previously described by Cacciò et al. (2002). The PCR mix contained 1×PCR buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM (each) deoxynucleoside triphosphate, 200 nM (each) primer, 2.5 units of Taq polymerase (New England BioLabs), and 5 µl of purified DNA as template for primary steps and 2.5 µl of primary PCR product for secondary steps, in a final volume of 50 µl. PCR was performed as follows: an initial denaturation step of 94 °C for 5 min, 40 cycles of 30 s at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 60 s and a final extension cycle of 7 min at 72 °C.

In all cases, for each reaction, a negative (water) and a positive control (bovine (oo)cysts) were added. The PCR products were submitted to 1.2% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and the gel image recorded under UV light. Gel images were captured with a gel documentation system (Gel Doc XR system, BioRad).

Following successful PCR, the products were purified (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare Europe GmbH, Germany) and sequenced on both strands (MWG Biotech,

Germany). Chromatograms and sequences were examined with Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) and BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>). Sequence searches were conducted with BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

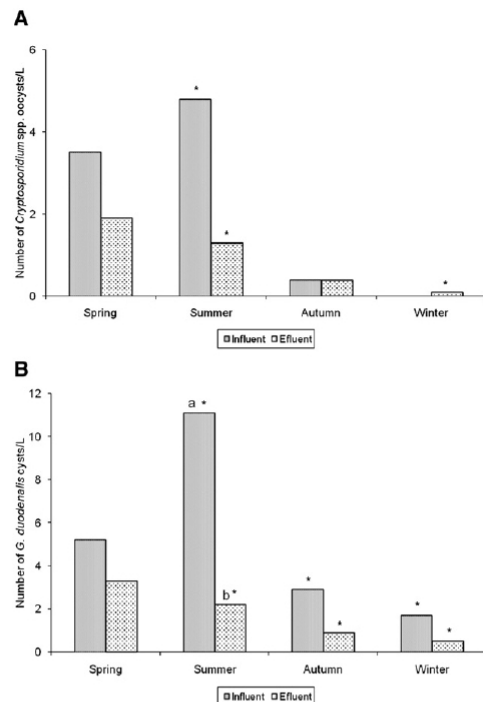
## 2.6. Statistics

The normality of the data was tested with the Kolmogorov-Smirnov test. For normally distributed results, differences in the concentrations of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in the final effluents from the influents in the drinking water treatments plants and throughout the year were compared by pairwise multiple comparison procedures (Student–Newman–Keuls method) and one-way ANOVA. Results that did not comply with the assumptions of normality were tested by Kruskal–Wallis test (nonparametric ANOVA) and Dunn's Multiple Comparison test. Analyses were carried out with GraphPad InStat® for Windows, version 3.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in water samples

A total of 128 samples (64 from untreated water and 64 from finished water) were collected for a period of one year. *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected in both influent and effluent of 14/16 (87.5%) and 12/16 (75.0%) plants respectively throughout the year, while *G. duodenalis* cysts were observed



**Fig. 2 – Removal efficacy of *Cryptosporidium* spp. oocysts (A) and *G. duodenalis* cysts (B) by drinking water treatment plants, according to season. Means in the same season with a different letter are significantly different. Means in different season with an asterisk are significantly different between each other.**

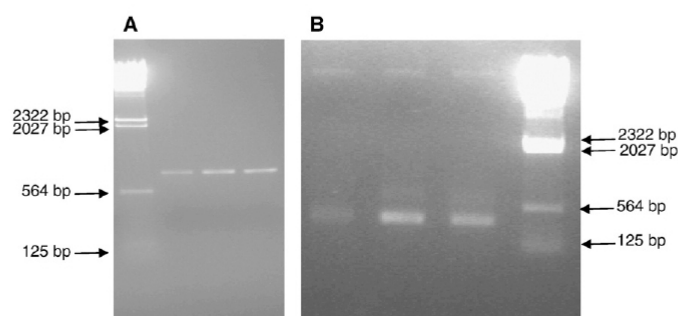
in both influent and effluent from all plants, 16/16 (100%), in the different seasons. In positive water samples, no empty (i.e., without internal characteristics, ghosts) or DAPI negative *Cryptosporidium* spp. oocysts or *G. duodenalis* cysts were found.

The mean concentrations of parasites in influent samples were 0.0–10.5 *Cryptosporidium* spp. oocysts per litre and 1.0–12.8 *G. duodenalis* cysts per litre. In final treated effluent, the mean concentration of parasites ranged from 0.0–3.0 oocysts per litre and 0.5–4.0 cysts per litre. There were no significant differences in the mean concentrations of the (oo)cysts per litre of either influent or effluent sample throughout the year in the different treatment plants. Furthermore, the concentration of (oo)cysts per litre during all 4 seasons of the year in the final effluent did not differ significantly among the 16 drinking water treatment plants, and therefore the treatments carried out in the different plants were ineffective for both protozoans (Table 1). Surprisingly, in 5 plants (31.2%) the concentration of (oo)cysts per litre was higher in the treated than in the untreated water, although the differences were not statistically significant (Table 1).

The lowest reductions in the protozoans were observed in plants 4, 5, 8 and 9. These plants only include small water treatment facilities with rapid filtration and/or disinfection processes. This system of processing drinking water resulted in the lowest removal efficiency in comparison with the other plants, although significant differences were not observed.

The distribution of results by season revealed that in all drinking water treatment plants, the highest numbers of (oo)cysts were found in spring and summer (Fig. 2A and B). There was a significantly higher ( $P < 0.05$ ) incidence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in influent and effluent samples collected in summer than those collected in winter, and there were no significant differences among the other seasons (Fig. 2A). In the case of *G. duodenalis* the concentrations of cysts per litre were significantly higher, in both the influent and effluent samples, in summer ( $P < 0.05$ ) than in autumn and winter (Fig. 2B).

Comparison of the 2 seasons in the year when most parasitic forms were detected (spring and summer), revealed that in the zone of capture or in the effluent, potentially infective stages of both parasites were observed in 15 (93.7%) plants. In the spring, treatments were totally ineffective for *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in 7 (43.7%) and 6 (37.5%) plants, respectively. In these facilities, the concentrations of both parasitic stages were greater in the drinking water (2–8 oocysts per litre; 2–12 cyst per litre) than in the influent water (0–2 oocysts per litre; 0–2 cyst per litre), although the differences were not statistically different.



**Fig. 3 – Typical agarose gel with the diagnostic profile for the 18S SSU rRNA gene from *Cryptosporidium* spp. (A) and the β-giardin from gene *G. duodenalis* (B).**

**Table 2 – Identification of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *G. duodenalis* detected in the influent and effluent samples from drinking water treatment plants**

Plant no. <sup>a</sup>	Influent		Effluent	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>G. duodenalis</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>G. duodenalis</i>
1	<i>C. parvum</i>	A-I+E	ND	A-I+E
4	ND	A-II+E	ND	A-II
6	ND	A-II+E	<i>C. parvum</i>	ND
8	<i>C. parvum</i>	A-II+E	<i>C. parvum</i>	A-II
14	<i>C. andersoni</i>	A-I+E	ND	ND
15	<i>C. hominis</i>	A-II	ND	ND

ND: DNA extraction was not achieved.

<sup>a</sup> Four samples were sequenced in each plant: two from influent and two from the effluent collected in spring and/or summer.

### 3.2. Molecular identification of parasites

PCR amplification of 18S SSU rRNA gene sequences was successful for samples containing *Cryptosporidium* spp. oocysts. For *G. duodenalis* isolates, PCR amplification of the 753-bp fragment of the  $\beta$ -giardin gene was performed (Fig. 3A and B). Samples that contained relatively high concentrations of nucleated (oo)cysts were selected for processing. The samples were collected from the influent and final effluent of the 16 plants during spring and summer. At least two PCR products from each plant were sequenced. Unfortunately, sequencing of the DNA of (oo)cysts from only 6 plants was achieved.

*Cryptosporidium parvum* was detected in the influent from plants 2 and 15, and *C. andersoni* and *C. hominis* in the influent from treatment plants 11 and 12 respectively (Table 2). *G. duodenalis* cysts of assemblage A-II were detected in plant number 12. In other samples two assemblages (A-I+E) and (A-II+E) were detected, in plants 2, 11 and 1, and in plants 6 and 15 respectively (Table 2).

The results obtained by the sequencing and/or PCR-restriction fragment length polymorphism of the (oo)cyst samples from the final effluent were similar to those identified in the influent. Nevertheless, in plants 1 and 15, cysts of assemblage A-II were identified in the final effluent in the plants in which two assemblages (A-II+E) were detected in the influent (Table 2).

## 4. Discussion

The great majority of apparently water-related health problems are the result of microbial (bacteriological, viral, protozoan) contamination, and the enteropathogens *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* are especially important in this respect (Fayer et al., 2000). These faecal protozoans are of principal concern in setting health-based targets for safety. Parasitological water quality often varies rapidly and over wide areas. Short-term peaks in concentrations of (oo)cysts may considerably increase the risk of cryptosporidiosis and giardiasis and may trigger waterborne outbreaks of these diseases. Furthermore, by the time contamination is detected, many people may have been exposed. For these reasons, end-product testing, even when frequent, cannot be relied on to ensure the safety of drinking water. Failure to ensure drinking water safety may expose the community to the risk of outbreaks of intestinal and other infectious diseases. Outbreaks associated with drinking water

are of particular concern because of their capacity to cause the simultaneous infection of large numbers of people. Wastewater outfall and rainfall-initiated runoff from urban, suburban and rural land can carry encysted stages of these pathogenic protozoa into untreated waters used for agricultural and recreational purposes and, in some locations, as a source of drinking water. Moreover, (oo)cysts can withstand normal water disinfection processes, and have been found in significant quantities in the final effluents of wastewater treatment plants (Robertson et al., 2006).

This study examined the prevalence and concentrations of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in sixteen drinking water treatment plants located in the same hydrographical basin in which pumping areas for the plants are located close to recreational areas, river beaches and in some cases grazing areas, mainly for cattle. Moreover, the efficiency of treatment plants in removing the protozoans was estimated and the species and genotypes were determined by means of a molecular assay in order to identify host sources of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* that contribute to contamination events and the risks that they pose to human health. The analysis of samples from sixteen plants revealed (oo)cysts in both influent and effluent samples from 14/16 (87.5%) and 12/16 (75.0%) plants respectively throughout the year, while *G. duodenalis* cysts were observed in both influent and effluent samples from all plants, 16/16 (100%), in the different seasons. In contrast, the occurrence that we report in untreated water and treated final effluents samples is higher than reported in different countries or zones (LeChevallier et al., 1991; Briancesco and Bonadonna, 2005; Karanis et al., 2006; Carmena et al., 2007). This contradiction can probably be explained by the higher level of environmental contamination or the lower protection of surface waters to the load of contaminant (oo)cysts in the area of study. In this study, all drinking treatment plants were located in the same hydrographical basin, and monitoring was carried out during all four seasons of the year, in both the influent and the effluent. The results corresponding to examination of the influent samples demonstrate that *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* infections are widespread throughout this region of Spain, with giardiasis being more widespread and occurring at greater intensity of infection than cryptosporidiosis. This is supported by epidemiological data in other countries (Fayer, 2004; Di Giovanni et al., 2006).

In this study no direct relation between the loading of population equivalent and the parasite concentrations was



observed. This may be due to the location of some plants, as the hydrographical basin includes areas where livestock farming predominates, especially cattle farming, and where there are numerous pastures and cultivated areas that are fertilized throughout the year, as well as areas dedicated to both large and small game hunting; there may therefore be uncontrolled contamination via animals, especially wild animals, which are important contributors of parasites in the contamination of drinking water (Ruecker et al., 2007). Wild animals were frequently observed during this study, residing in the natural vegetation buffer zones or directly within agricultural and urban settings.

The presence of high mean concentrations of *Cryptosporidium* spp. oocysts (0.5–3 oocysts per litre) and *G. duodenalis* cysts (0.5–4 cysts per litre) in the final effluent is of public health concern. The ID50 has been estimated to be as low as 83–123 oocysts for *Cryptosporidium* spp. (DuPont et al., 1995; Chappell et al., 2006) and 19–50 cysts for *G. duodenalis* cysts (Adam, 2001) and action levels of 10–30 oocysts per 100 litres and 3–5 cysts per 100 litres has been proposed by Haas and Rose (1995) and Wallis et al. (1996), respectively. During recent years, several waterborne outbreaks by *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* have been documented worldwide (Fayer, 2004; Yoder et al., 2004; Giangaspero et al., 2007; Sunderland et al., 2007). Nevertheless, in Spain very few epidemiological surveys have been carried out to establish the occurrence of these protozoa in drinking water, and no significant waterborne outbreaks of cryptosporidiosis and giardiasis have been reported (Rodríguez-Hernández et al., 1994, 1996; Montemayor et al., 2005; Gómez-Couso et al., 2005, 2006; Carmena et al., 2007).

Although *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* were found in large numbers of samples throughout the year, the highest numbers of (oo)cysts were found in spring and summer. The seasonality of these parasites has been investigated in a few studies, with diverse results. Although a similar seasonal pattern has been reported by some authors (Isaac-Renton et al., 1996; Cacciò et al., 2003; Montemayor et al., 2005; Carmena et al., 2007), it has not been confirmed by others (Hashimoto et al., 2001); thus, it is not clear whether or not seasonality is a general feature of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* contamination. In the present study, the increase in parasitic forms, especially in the influent water in treatment plants in spring and summer may be caused by activities associated with agricultural practices (fertilization of cropped land with slurry) and farming activities, such as calving, lambing and grazing, especially of adult cows and heifers. The detection of *C. hominis* in the influent suggests that infected humans have a role in the contamination of these waters. Moreover, at these times of year, many people use the river beaches and recreational areas, especially in the holiday periods, to take part in sporting activities, including river fishing. These data suggest that monitoring of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* must be intensified during spring and summer, the period of highest prevalence of these protozoa in drinking water treatment plants.

None of the treatment processes carried out in the 16 plants during the different times of year was totally effective, and significant reductions in the concentration of (oo)cysts per litre were not observed in the effluent samples. The average removal efficiencies at these water treatments plants ranged between 0.12-log and 1.04-log for *Cryptosporidium* spp. and between 0.04-log and 0.96-log for *G. duodenalis*. Nevertheless,

Betancourt and Rose (2004) in conventional water treatment plants observed that protozoa removals were higher (1.5-log–2.5-log). Major waterborne cryptosporidiosis and giardiasis outbreaks associated with contaminated drinking water have been linked to evidence of suboptimal treatment. *Cryptosporidium* spp. oocysts are more resistant than *G. duodenalis* cysts to removal and inactivation by conventional water treatment (coagulation, flocculation, sedimentation, filtration and disinfection processes). The majority of the data on performance of treatment processes in removing (oo)cysts from drinking water have been obtained from pilot tests, and few studies have been performed in full-scale conventional water treatment plants. Pilot studies have demonstrated that removal of the enteropathogens throughout all stages of the conventional treatment is largely influenced by the effectiveness of coagulation pretreatment, which along with clarification constitutes the first treatment barrier against protozoan breakthrough (Betancourt and Rose, 2004). In the present study, the highest percentages of elimination of parasitic forms were observed in plants that applied conventional treatment and that included coagulation pretreatment, although performance was still very poor and significant differences were not observed. The lower efficiency of the plants may be due to the fact that the plants are not permanently staffed, automated procedures are not available and therefore the plants function irregularly. Although the European Community environmental legislation states that water intended for human consumption should not contain pathogenic organisms (Directive 98/83/CE), in Spain there are no specific regulations relating to tolerable limits of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* in drinking water. It is therefore urgent that the health authorities rethink the relevance of the contamination levels of both parasites in drinking water and that they develop adequate countermeasures with the aim of protecting human and animal populations.

As regards the determination of species and genotypes of these parasites by means of a molecular assay, unfortunately, the DNA of (oo)cysts from only 6 plants was finally able to be sequenced. This may have been due to inhibitors present in the water, the small volumes used or to loss of parasites during concentration and purification before carrying out the PCR. Although PCR is a highly sensitive and useful technique, so far, we have only been able to apply it successfully to samples with a high parasite load, which makes purification of the oocysts/cysts easier. The PCR technique is therefore of rather limited use with water samples with low parasite loadings. *Cryptosporidium hominis* (formerly *C. parvum* genotype I or human, involved in the anthroponotic route of transmission) and Assemblage A *G. duodenalis* (genotype A-II), responsible for anthroponotic transmission, were detected in the influent at plant 15, suggesting that the majority of (oo)cysts in the untreated water originated from human infections. The determination of species and genotypes of these parasites by means of a molecular assay helps in the identification of host sources of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* that contribute to contamination. However, caution is required when extrapolating molecular data from water samples to determine host sources of contamination. In studies that determine the host specificity of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* there is a direct association between the host being studied and the faecal material used for typing parasites (Ryan et al., 2003; Zhou et al.,

2004; Castro-Hermida et al., 2006a,b). There is no such direct association for isolates from water samples. Therefore, the host source can only be inferred from available host–parasite information and molecular phylogenies, which can then be further supported by land use information. For example, the host source of *C. parvum* cannot be inferred from single occurrence detected; however, when the known host sources of *C. parvum* are combined with land use analysis, the data suggest that cattle, deer and humans are the most probable sources within the watershed (Xiao et al., 2004). In this study, *C. parvum* was detected in the influent water in plants 1 and 8, whereas *C. andersoni* (which infects the abomasums of juvenile and mature cattle) was detected in drinking water treatment plant 14. Moreover, only *C. parvum* was observed in the effluent from plants 6 and 8. Nevertheless, *G. duodenalis* cysts of assemblage A-II were detected in the final effluent from plants 4 and 8 where two assemblages (A-II + E) had been detected in the influent. One possible explanation is the settling of cysts, an effect previously shown to reduce rates of occurrence (Brookes et al., 2005). The data reinforce the complexity associated with contamination events within a plant and the challenges associated with capturing and accounting for these dynamic spatial and temporal variations by grab sampling methods. Another possible factor is the transport behaviour of cysts in overland flow within of the plant. In the sediment, cysts are subjected to deposition once they are present in overland flow or low flow such as in different tank treatment processes. The low settling velocities indicate that cysts will settle out of suspension very slowly. In cases where cysts are attached to particles, settling of cysts will be linked to the settling velocity of the particles (Searcy et al., 2005; Dai and Boll, 2006). The presence of one assemblage or another will then depend on the higher or lower concentration of one or other, or simply on random processes.

The basic and essential requirements to ensure the safety of drinking water are a “framework” for safe water, comprising health-based targets established by a competent health authority; adequate and properly managed systems (adequate infrastructure, proper monitoring and effective planning and management), and a system of independent surveillance. It is important that drinking water treatment authorities rethink the relevance of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* contamination levels in drinking water and develop adequate countermeasures.

### Acknowledgements

The present study was financially supported by the Xunta de Galicia, through the Consellería de Innovación e Industria (PGIDIT05RAG50306PR), Ministerio de Educación y Ciencia, through the Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias (RTA2006-00007-00-00) and by the Fondo Social Europeo.

### REFERENCES

- Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev 2001;14:447–75.
- Betancourt WQ, Rose JB. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. Vet Parasitol 2004;126:219–34.
- Briancesco R, Bonadonna L. An Italian study on *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater, fresh water and treated water. Environ Monit Assess 2005;104:445–57.
- Brookes JD, Antenucci J, Hipsey M, Burch MD, Ashbolt NJ, Ferguson C. Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs. Environ Int 2004;30:741–59.
- Brookes JD, Hipsey M, Burch MD, Regel RH, Linden LG, Ferguson C. Relative value of surrogate indicators for detecting pathogens in lakes and reservoirs. Environ Sci Technol 2005;39:8614–21.
- Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the  $\beta$ -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int J Parasitol 2002;32:1023–30.
- Cacciò SM, De Giacomo M, Alicino FA, Pozio E. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. Appl Environ Microbiol 2003;69:3393–8.
- Carmena D, Aguinalde X, Zigorraga C, Fernández-Crespo JC, Ocio JA. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. J Appl Microbiol 2007;102:619–29.
- Castro-Hermida JA, Delafosse A, Pors I, Ares-Mazás E, Chartier C. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. Vet Rec 2005;157:623.
- Castro-Hermida JA, Almeida A, González-Warleta M, Correia da Costa JM, Mezo M. Prevalence and preliminary genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from asymptomatic heifers in Galicia (NW, Spain). J Eukariot Microbiol 2006a;53 S22–3.
- Castro-Hermida JA, Almeida A, González-Warleta M, Correia da Costa JM, Mezo M. Prevalence and preliminary genetic analysis of *Giardia* isolated from adult sheep in Galicia (NW, Spain). J Eukariot Microbiol 2006b;53:S172–173.
- Castro-Hermida JA, Almeida A, González-Warleta M, Correia da Costa JM, Rumbo-Lorenzo C, Mezo M. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. Parasitol Res 2007a;101:1443–8.
- Castro-Hermida JA, González-Warleta M, Mezo M. Natural infection by *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in sheep and goats in Galicia (NW Spain). Small Rumin Res 2007b;72:96–100.
- Center of Disease Control and Prevention. Fact sheet-crypto-protection against recreational water illness; 2006. <http://www.cdc.gov/healthyswimming/cryptofacts.htm>. [Online].
- Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry R, Widmer G, Akiyoshi DE, Tanriverdi S, et al. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006;75:851–7.
- Craun GF, Calderon RL, Craun MF. Outbreaks associated with recreational water in United States. Int J Environ Health Res 2005;15:243–62.
- Dai X, Boll J. Settling velocity of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. Water Res 2006;40:1321–5.
- Di Giovanni G, Betancourt WQ, Hernandez J, Assadian NW, Flores Margez JP, Jaramillo, et al. Investigation of potential zoonanthropotic transmission of cryptosporidiosis and giardiasis through agricultural use of reclaimed wastewater. Int J Environ Health Res 2006;16:405–18.
- Directive 92/43/EEC. Council of the European Communities. Directive on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. J officiel de l'Union Européenne 1992;L206:0007–50.
- Directive 98/83/CE. Qualité des eaux destinées à la consommation humaine. J officiel de l'Union Européenne 1998;L330:0032–54.
- DuPont HL, Chappell CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, Jakubowski W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. N. Engl. J. Med. 1995;332:855–9.
- Enriquez C, Nwachuku N, Gerba CP. Direct exposure to animal enteric pathogens. Rev Environ Health 2001;16:117–31.



- Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol* 2004;126:37–56.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 2000;30:1305–22.
- Giangaspero A, Berrilli F, Brandonisio O. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. *Parasitol Res* 2007;101:1169–82.
- Gómez-Couso H, Méndez-Hermida F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazás E. *Giardia* in shellfish-farming areas: detection in mussels, river water and waste waters. *Vet Parasitol* 2005;133:13–8.
- Gómez-Couso H, Méndez-Hermida F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazás E. *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. *J Food Prot* 2006;69:185–90.
- Haas CN, Rose JB. Developing an action level for *Cryptosporidium*. *J Am Water Works Assoc* 1995;87(9):81–4.
- Hancock D, Besser T, Lejeune J, Davis M, Rice D. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int J Food Microbiol* 2001;66:71–8.
- Hashimoto A, Hirata T, Kunikane S. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in a conventional water purification plant. *Water Sci Technol* 2001;43:89–92.
- Isaac-Renton J, Moorehead W, Ross A. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two community drinking water supplies: cysts levels, parasite viability, and health impact. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:47–54.
- Karanis P, Papadopoulos C, Kimua A, Economou E, Kourenti C, Sakkas H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural, drinking and recreational water of northwestern Greece. *Acta Hydrochim Hydrobiol* 2002;30:49–58.
- Karanis P, Sotiriadou I, Kartashev V, Kourenti C, Tsvetkova N, Stojanova K. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environ Res* 2006;102:260–71.
- LeChevallier MW, Norton ND, Lee RG. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Appl Environ Microbiol* 1991;57:2610–6.
- McQuinn RM, Clancy JL. Modifications to United States Environmental Protection Agency Methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:267–74.
- Meyer EA, Jarroll EJ. Giardiasis. *Am J Epidemiol* 1980;111:1–12.
- Montemayor M, Valero F, Cofre J, Lucena F. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. *J Appl Microbiol* 2005;99:1455–62.
- Reynolds KA, Mena KD, Gerba CP. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev Environ Contam Toxicol* 2008;192:117–58.
- Robertson LJ, Hermansen L, Gjerde BK. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:5297–303.
- Rodríguez-Hernández J, Canut-Blasco A, Ledesma-García M, Martín-Sánchez AM. *Cryptosporidium* oocysts in water for human consumption. Comparison of staining methods. *Eur J Epidemiol* 1994;10:215–8.
- Rodríguez-Hernández J, Canut-Blasco A, Martín-Sánchez AM. Seasonal prevalences of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in children attending day care centres in Salamanca (Spain) studied for a period of 15 months. *Eur J Epidemiol* 1996;12:291–5.
- Ruecker NJ, Braithwaite SL, Topp E, Edge T, Lapen DR, Wilkes G, et al. Tracking host sources of *Cryptosporidium* spp. in raw water for improved health risk assessment. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:3945–57.
- Ryan U, Xiao L, Read C, Zhou L, Lal AA, Pavlasek I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:4302–7.
- Searcy KE, Packman AI, Atwill ER, Harter T. Association of *Cryptosporidium parvum* with suspended particles: impact on oocysts sedimentation. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:1072–8.
- Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol* 2000;30:1379–93.
- Smith HV, Cacciò SM, Cook N, Nichols RAB, Tait A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet Parasitol* 2007;149:29–40.
- Sterling CR. Waterborne cryptosporidiosis. In: Dubey JP, Speer CA, Fayer R, editors. *Cryptosporidiosis of man and animals*. Boca Raton, Fla: CRC Press; 1990. p. 51–8.
- Sunderland D, Graczyk TK, Tamang L, Breyse PN. Impact of bathers on levels of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts in recreational beach waters. *Water Res* 2007;41:3483–9.
- Tamburrini A, Pozio E. Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int J Parasitol* 1999;29:711–5.
- Thompson RCA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 2000;30:1259–67.
- U.S. Environmental Protection Agency. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. EPA 821-R-01-025. Office of Ground Water and Drinking Water Technical Support Center. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency; 2001.
- Wallis PM, Erlandsen SL, Isaack-Renton JL, Olson ME, Robertson WFJ, van Keulen H. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. isolated from drinking water in Canada. *Appl Environ Microbiol* 1996;62(8):2789–97.
- World Health Organization. Guidelines for drinking water quality; Addendum-microbial agents in drinking water. 2nd ed. Switzerland: Geneva; 2002.
- Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, et al. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3386–91.
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:72–97.
- Yoder J, Blackburn B, Gunther G, Hill V, Levy D, Chen N. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water — United States, 2001–2002; 2004. Washington, DC.
- Zhou L, Fayer R, Trout JM, Ryan UM, Schaefer III FW, Xiao L. Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:7574–7.





***Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies  
of Galicia, Spain.**

Castro-Hermida, J.A.; [García-Presedo, I.](#); González-Warleta, M.;  
Mezo, M.

***Water Research*, 44: 5887-5896. 2010.**



El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *Giardia* spp. en ARFs (n=28), ETAPs (n=52) y EDARs (n=50) en Galicia. En las áreas recreativas analizadas, se observaron formas infectantes de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en 16 (57,1%; 1-60 OPL) y 17 (60,7%; 1-160 QPL) muestras, respectivamente. Al considerar los afluentes de las plantas potabilizadoras, se detectaron ooquistes en 21 ETAPs (40,4%; 1-13 OPL) y se observaron quistes en 22 ETAPs (42,3%; 1-7 QPL). En los efluentes, se identificaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 17 ETAPs (32,7%; 1-4 OPL) y quistes de *Giardia* spp. en 19 ETAPs (36,5%; 1-5 QPL). Las concentraciones más elevadas se obtuvieron en las EDARs; así, en el afluente se detectaron ooquistes en 29 (58,0%; 1-80 OPL) y quistes en 49 (98,0%; 2-14.400 QPL) depuradoras. Finalmente, se observó *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en los efluentes de 32 EDARs (64,0%; 1-120 OPL) y 48 EDARs (96,0%; 2-6.000 QPL), respectivamente. En todas las muestras analizadas, los porcentajes de viabilidad oscilaron entre un 90,0%-95,0%. Se comprobó que en las EDARs situadas en la franja costera los efluentes vertían directamente al mar; mientras que las depuradoras de zonas interiores eliminaban sus aguas directamente al río; situación sanitaria que puede poner en riesgo la sanidad animal y la salud pública de las zonas.



Available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.elsevier.com/locate/watres](http://www.elsevier.com/locate/watres)

## Cryptosporidium and Giardia detection in water bodies of Galicia, Spain

José Antonio Castro-Hermida\*, Ignacio García-Presedo, Marta González-Warleta, Mercedes Mezo

Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Instituto Galego de Calidade Alimentaria-Xunta de Galicia, Carretera AC-542 de Betanzos a Mesón do Vento, Km 7.5, CP 15318 Abegondo (A Coruña), Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 April 2010

Received in revised form

5 July 2010

Accepted 6 July 2010

Available online 14 July 2010

#### Keywords:

Cryptosporidium

Giardia

Rivers

Drinking water

Wastewater

Spain

### ABSTRACT

The objective of this study was to determine the mean concentration (per litre) of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in recreational river areas ( $n = 28$ ), drinking water treatments plants (DWTPs;  $n = 52$ ) and wastewater treatment plants (WWTPs;  $n = 50$ ) in Galicia (NW Spain). Water samples from rivers and from the influent (50–100 l) and the treated effluent (100 l) of the water plants were filtered using Filta-Max filters (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA). A total of 232 samples were processed and the (oo)cysts were concentrated, clarified by IMS and then detected by IFAT. The viability was determined by applying fluorogenic vital dye (PI).

In the recreational areas, infective forms of *Cryptosporidium* and *Giardia* were detected in 16 (57.1%; 1–60 oocysts per litre) and 17 (60.7%; 1–160 cysts per litre) samples, respectively. In the water flowing into the water treatment plants, oocysts were detected in 21 DWTPs (40.4%; 1–13 oocysts per litre) and cysts were observed in 22 DWTPs (42.3%; 1–7 cysts per litre). In the effluents from the treatment plants, *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts were identified in 17 DWTPs (32.7%; 1–4 oocysts per litre) and in 19 DWTPs (36.5%; 1–5 cysts per litre), respectively. The highest concentrations of (oo)cysts were found in the WWTPs; specifically, oocysts were detected in 29 (58.0%; 1–80 oocysts per litre) and cysts in 49 (98.0%; 2–14,400 cysts per litre) WWTP effluents. *Cryptosporidium* and *Giardia* were detected in 32 (64.0%; 1–120 oocysts per litre) and 48 (96.0%; 2–6,000 cysts per litre) WWTP effluents, respectively. The percentage viability of the (oo)cysts ranged between 90.0% and 95.0%. In all samples analysed. Moreover, it was found that the effluents from coastal WWTPs were discharged directly into the sea, while inland WWTPs were discharged directly into rivers. The concentrations of both enteropathogens detected in effluents from WWTPs therefore represent a significant risk to human and animal health.

These results demonstrate the wide distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the environment, the ineffectiveness of treatments in DWTPs and WWTPs in reducing/inactivating both protozoa and the need to monitor the presence, viability and infectivity of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water bodies. In conclusion, the findings suggest the need for better monitoring of water quality and identification of sources of contamination.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Tel.: +34 981 647 902x248; fax: +34 981 673 656.

E-mail address: [jose.antonio.castro.hermida@xunta.es](mailto:jose.antonio.castro.hermida@xunta.es) (J.A. Castro-Hermida).

0043-1354/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2010.07.010

## 1. Introduction

One of the Millennium Development Goals is to halve the number of people without safe drinking water by 2015 (WBG, 2009; WHO, 2009). In many poorly developed countries the infrastructure for providing safe drinking water is fragmentary or absent and there are high endemic levels of waterborne disease. Although in more developed countries the systems and infrastructure may be generally effective, poor catchment management and systems failures often result in outbreaks of waterborne infection (Cummins et al., 2010; Smith and Nichols, 2010).

It is well known that protozoan parasites of the genera *Cryptosporidium* (phylum Apicomplexa) and *Giardia* (subphylum Sarcostigophora) are important causes of disease and morbidity in humans and of losses in livestock production. Clinically, these protozoans infect distal and proximal regions of the small intestine, occupying epicellular and extracellular intestinal niches, respectively, which affect host–parasite interactions, pathophysiology and disease mechanisms (Reynolds et al., 2008; Ortega-Pierres et al., 2009).

These zoonotic enteropathogens are included in the WHO “Neglected Diseases Initiative” because when considered together, cryptosporidiosis and giardiasis exhibit a considerable and increasing global burden, and impair the ability of infected people to achieve their full potential, both developmentally and socio-economically (Savioli et al., 2006). Both parasites are transmitted via the faecal–oral route, and the consumption of contaminated drinking water and use of recreational waterways are significant avenues for acquisition of infection in developed countries. In fact, cryptosporidiosis and giardiasis remain a public health concern, as demonstrated by continued outbreaks of these diseases attributable to waterborne transmission (Fayer et al., 2000; Slifko et al., 2000; Thompson, 2000; Coupe et al., 2006; Graczyk et al., 2010; Mason et al., 2010; Yoder and Beach, 2010).

Infections by *Cryptosporidium* and *Giardia* generally occur in companion and wild animals, but the public health relevance of potentially zoonotic transmission remains to be determined (Thompson et al., 2008, 2010; Bowman and Lucio-Forster, 2010; Cacciò and Sprong, 2010; Fayer, 2010). These enteric protozoan pathogens have been associated with economic losses associated with the occurrence of diarrhoea in productive animals, and also the death of animals, especially neonatal domestic ruminants (Ralston et al., 2003; Castro-Hermida et al., 2005, 2007a,b; Santín et al., 2009; Feng, 2010; Wyatt et al., 2010).

The transmissive stages (i.e., oocysts and cysts) are environmentally robust and therefore ubiquitous in aquatic habitats and have been found in sludge, irrigation and reclaimed waters, recreational areas, and in the effluents from drinking water treatment plants (DWTPs) and wastewater treatment plants (WWTPs). There is therefore a risk that surface water, wastewater and/or biosolids applied to agricultural lands may contain these pathogens (Ono et al., 2001; Cacciò et al., 2003; Montemayor et al., 2005; Gómez-Couso et al., 2005, 2006; Coupe et al., 2006; Carmena et al., 2007; Ruecker et al., 2007; Wilkes et al., 2009; Chalmers et al., 2010; Graczyk et al., 2010). Forage food may therefore become

contaminated leading to disease in livestock. Infected animals will then amplify the numbers of pathogens and contaminate the environment, and even act as pathogen reservoirs, showing no obvious signs of disease or clinical symptoms, yet ultimately spread *Cryptosporidium* and *Giardia* to human food or directly to humans (Fayer, 2004; Briancesco and Bonadonna, 2005; Farizawati et al., 2005; Giovanni et al., 2006; Smith et al., 2007, 2010; Castro-Hermida et al., 2008, 2009). Future prevention of zoonotic diseases and protection of health will probably depend on controlling contamination of feed and water consumed by the animals themselves.

The infectious doses for *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* have been established to be as low as 10 (oo)cysts (Fayer et al., 2000; Adam, 2001) and it has been estimated that the risk of infection by accidental ingestion of *Cryptosporidium* and by *Giardia* during bathing in water with  $>2 \times 10^{-1}$  l was greater than 1 per 10,000 immunocompetent individual (Coupe et al., 2006), a risk value considered significant according to USEPA (2001). The risk posed by the presence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water bodies, together with the low number of parasites required to induce infection, has become a major concern for the water and sanitary authorities responsible for providing safe drinking water supplies for human and animal consumption. In the US, the US Environmental Protection Agency (USEPA) has implemented national drinking water regulations and developed innovative technologies to improve the detection, monitoring and surveillance of these parasites in drinking water (US Environmental Protection Agency, 2001, 2002). Similar initiatives have been implemented in other countries including England (Drinking Water Inspectorate, 2003), Canada (Health Canada, 2004) and New Zealand (Ministry of Health of New Zealand, 2005). The European Drinking Water Directive (Council Directive 98/83/EC) establishes the goal that all the state members should provide drinking water supplies free of pathogenic organisms. The International Organization for Standardization specifies a method (ISO 15553:2006) that is applicable for the detection and enumeration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. It is applicable for the examination of surface and ground waters, treated waters, mineral waters, swimming pool and recreational waters. Nevertheless, in Spain there are no specific regulations relating to tolerable limits *Cryptosporidium* and *Giardia* in drinking water.

Moreover, there are no requirements for testing recreational water and reclaimed wastewater for the presence of *Cryptosporidium* and *Giardia*; even though analyses of outbreaks have shown that the pathogens can be shed into recreational waters (Karanis et al., 2006; Giangaspero et al., 2007; Sunderland et al., 2007; Pintar et al., 2010). Although these pathogens are included as category B biodefence agents on the National Institutes of Health (NIH) list in numerous countries, there is no specific legislation for the routine monitoring of drinking water sources, recreational waters or wastewater reuse for these parasites. Clearly, appropriate legislation is required with regard to the routine analysis of *Cryptosporidium* and *Giardia* in order to improve water quality.

The aim of the present study was therefore to obtain an accurate picture of the extent of contamination of water bodies (surface, drinking water, wastewater and reclaimed) by *Cryptosporidium* and *Giardia* in an area of Galicia (NW, Spain),

in order to assess the risk of waterborne cryptosporidiosis and giardiasis. This aim was achieved by determining the mean concentrations (per litre) of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in recreational river areas, and in the influent and final effluent from drinking water treatments plants (DWTPs) and wastewater treatment plants (WWTPs) in Galicia. This information will be important for prioritizing environmental clean-up and/or control contamination of water supplies.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Site selection and description of study area

The present study was carried out in 55 municipalities in Galicia, NW Spain (Fig. 1). The area selected for study (total surface area, 29,575 km<sup>2</sup>; 43°47' to 41°49' N, 6°42' to 9°18' W) is one of the most important regions because several zones were declared as Sites of Community Importance (SCI), by the European Council Habitats Directive (92/43/EEC) in 2001. Nevertheless, there is a significant level of farming activity in the area, predominantly cattle farming (livestock census: 191,214): a large area of the land is dedicated to agriculture and grasslands occupy over 50% of the useful agricultural land, and moreover, the livestock usually graze throughout the year and farmers spread agricultural slurry on pasture land. Bovine cryptosporidiosis and giardiasis have been reported to be prevalent in the study area (Castro-Hermida et al., 2002, 2006) and the runoff from agricultural land may therefore be a potential source of contamination of surface water.

There are numerous small rivers in the study area that are the sources of water destined for human consumption, providing drinking water to approximately 478,848 people. One sample of untreated water (influent) and another of treated water (final effluent) were collected at 52 DWTPs (Fig. 1). The drinking water is treated in conventional large and medium-size water plants. Treatment includes coagulation, flocculation, and clarification through sedimentation, filtration and disinfection processes. However, some small communities use surface water supplies after minimal treatment, usually only chlorination. However, drinking water sources are generally open to varied recreational uses, including swimming, especially during the spring–summer and all the final effluents from the WWTPs in the zone are discharged into the hydrographical basins. A further objective of the study was therefore to establish the degree of contamination by *Cryptosporidium* and *Giardia* in the main recreational areas, and therefore the concentrations of these parasites were determined at 28 of the most important recreational areas in the study area (Fig. 1).

All of the final effluents from the WWTPs in the study area are discharged directly into the rivers (recreational areas, river beaches and pumping areas for DWTPs) or into marine estuaries where bivalve molluscs are cultured for human consumption. The main processes in the selected treatment plants consist of primary treatment (pumping, screening, storage and/or preconditioning) and secondary treatment (coagulation and flocculation, sedimentation and filtration); some plants also carry out tertiary treatments (UV or ozone). Outbreaks may occur during malfunctioning of treatment

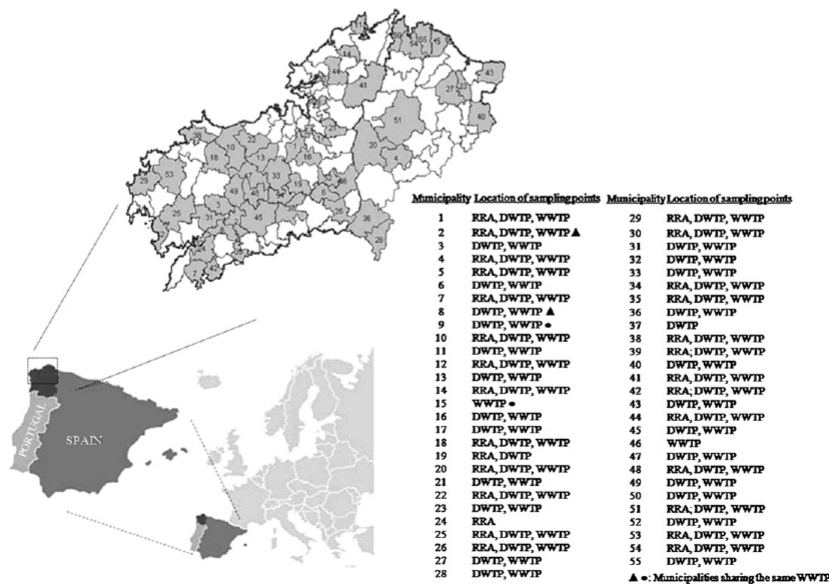


Fig. 1 – Geographical location of the sampling points in relation to the 55 municipalities in Galicia (NW, Spain) where the following water samples were obtained: recreational river areas (RRA; n = 28); influent and final effluent from drinking water treatments plants (DWTPs; n = 52) and wastewater treatment plants (WWTPs; n = 50).



plants, which would enable the parasites to bypass the treatment processes more easily. Wastewater treatment plants are the potential sources of contamination to watersheds if the effluents are not treated adequately before being discharged into nearby rivers or ponds. The mean concentrations (per litre) of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in influent and final effluent from 50 WWTPs in the study area were also determined (Fig. 1).

## 2.2. Concentration of *Cryptosporidium* and *Giardia* (oo)cysts from water samples

Water samples (50 l) were collected from 28 main recreational areas (Fig. 1). Moreover, two samples (25–100 l), one of untreated water (influent) and other of treated water (final effluent), were collected from each of the 52 DWTPs and 50 WWTPs throughout 2009 (Fig. 1). When collecting the samples, the holding times of each step in the process were respected so that the water samples and wastewater were analysed at the same stage of the treatment process.

The 232 water samples were filtered through Filta-Max filters (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA) with the aid of a motorized pump located on the inlet side of the filter. An index card was completed for each sample, with the following data: sampling date, origin and number of identification. The Filta-Max filters were transported to the laboratory in a cool box and processed within 24 h of collection. Samples were therefore taken immediately to the laboratory and processed with the Filta-Max Automatic System (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA). Filtration cartridges were set up according to the manufacturer's instructions, and all the samples were filtered at recommended flow rates. Elution of filters and final concentration of the sample were carried out with the same equipment, and by following the manufacturer's instructions. Briefly, this involved placing a membrane filter (3- $\mu$ m pore size; polysulphone) in the base of the sample concentrator, inserting the filter module into the apparatus, adding 600 ml of phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.01% Tween 20 (PBST) to the reservoir, and unscrewing the filter housing to allow expansion of the foam pads. The foam pads were washed by pumping the plunger and then transferring the PBST elution volume into the magnetic particle concentrator and filtering the entire volume to approximately 20–25 ml, under vacuum. The process was repeated with a second volume (600 ml) of PBST and the resulting concentrate was pooled with the first concentrate and then filtered under vacuum to produce a final volume of around 20 ml. This was then transferred into a 50-ml centrifuge tube. The filter membrane was transferred to a small sealable plastic bag, and 8–10 ml of PBST added, the membrane was kneaded manually, and the spent wash volume was pooled with the primary eluate. The membrane washing procedure was repeated twice. The sample was resuspended to 50 ml with PBST and centrifuged at 1500g for 5 min. The supernatant was aspirated to 10 ml, and the resuspended pellet was transferred to a Leighton tube and subjected to Immunomagnetic Separation technology (IMS).

The IMS procedure was performed as described in USEPA method 1623 (USEPA, 2001). Briefly, each 10-ml sample concentrate was added to a Leighton tube containing 1 ml of

10 $\times$  SL buffer A and 1 ml of 10 $\times$  SL buffer B (Dynabeads® GC-Combo, Invitrogen Dynal, A.S., Oslo, Norway). One hundred microlitres of *Cryptosporidium* and *Giardia* IMS beads were added to each tube, and samples were incubated for 1 h at room temperature with constant rotation. The Leighton tubes were then placed in a magnetic particle concentrator and rocked gently for 2 min through an angle of 90°. The supernatant was decanted, the tubes were removed from the magnetic particle concentrator, and 1 ml of 1 $\times$  SL buffer A was added to each. The tubes were rocked gently to resuspend the bead-(oo)cyst complexes. The suspension was transferred to 1.5 ml polypropylene tubes, with a Pasteur pipette, and these tubes were then placed in a second magnetic particle concentrator and rocked for 1 min. The supernatants were aspirated, the magnet removed, and 50  $\mu$ l of 0.1 N HCl added to each sample, which was vortexed for a minimum of 10 s. The samples were allowed to stand for 10 min in an upright position, then vortexed for a further 10 s, and magnets were inserted. The tubes were left undisturbed for 2 min. The beads were collected at the back of the tube and the acidified suspension was transferred to the wells of a two-welled slide, each containing 5  $\mu$ l of 1.0 N NaOH.

## 2.3. Staining procedure for recovered *Cryptosporidium* and *Giardia* (oo)cysts

The samples were dried, fixed in acetone, and 50  $\mu$ l of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-*Cryptosporidium* and anti-*Giardia* MABs (Aqua-Glo; Waterborne Inc., New Orleans, La) were placed in each well. The slides were placed in a humidified chamber, incubated (37 °C for 45 min), and excess FITC-MAB was aspirated. Any remaining FITC-MAB was removed by adding 50  $\mu$ l of PBS to each well, leaving the slides for 5 min, and aspirating the excess PBS. A 50  $\mu$ l aliquot of propidium iodide (PI) solution (1 mg/ml in distilled water) was placed in each well. The slides were left at room temperature for 15 min, and excess PI solution was removed by washing the slides twice in PBS and once in distilled water. The slides were placed in the dark until dry, then a 10  $\mu$ l aliquot of mounting medium (2% diazabicyclooctane [DABCO] in 60% glycerol 40% PBS) was placed in each well, and the slides were sealed for subsequent examination under epifluorescence optics, as described in method 1623 (USEPA, 2001). *Cryptosporidium* oocysts were identified on the basis of their size, shape, and the presence of a suture on the oocyst wall, at a magnification of 400 $\times$  in a Nikon Eclipse 90i microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). *Giardia* cysts were identified by their size, shape and the pattern and intensity of immunofluorescence assay staining (i.e., bright green fluorescence of the cyst wall). Parasites in each slide well were enumerated, and the mean numbers extrapolated to concentrations of parasites per litre of sample. Positive and negative controls were used, as recommended in Method 1623. All calculations were performed taking into account the mean percentage recoveries determined by McCuin and Clancy (2003) for *Cryptosporidium* oocysts (50  $\pm$  13%) and *Giardia* cysts (41  $\pm$  9%) using Filta-Max system and IMS. A simultaneous study of uptake/exclusion of fluorogenic PI vital dye was carried out. The technique was based on the uptake of PI fluorogenic vital dye by dead oocysts, not by live oocysts (Rose

The normality of the data was checked using the Kolmogorov–Smirnov test. For normally distributed results, differences in the concentrations of *Cryptosporidium* and *Giardia* at the different points (river recreational areas; influent and final effluent from DWTPs and WWTPs) were compared by pairwise multiple comparison procedures (Student–Newman–Keuls method) and one-way ANOVA. Results that did not comply with the assumptions of normality were tested by Kruskal–Wallis test (nonparametric ANOVA) and Dunn’s Multiple Comparison test. Analyses were carried out with GraphPad Instat® for Windows, version 3.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), and differences in the variables were considered significant at the 0.05 level of confidence.

### 3.1. Prevalence and concentration of parasite forms of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water samples

In the recreational areas, infective forms of *Cryptosporidium* and *Giardia* were detected in 16 (57.1%; 1–60 oocysts per litre) and 17 (60.7%; 1–160 cysts per litre) samples, respectively. Considering the influents of the water treatment plants, oocysts were detected in 21 DWTPs (40.4%; 1–13 oocysts per litre) and cysts were observed in 22 DWTPs (42.3%; 1–7 cysts per litre). In the effluents, *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts were identified in 17 DWTPs (32.7%; 1–4 oocysts per litre) and in 19 DWTPs (36.5%; 1–5 cysts per litre), respectively. The highest concentrations were obtained in the WWTPs; specifically, oocysts were detected in the influents of 29 WWTPs (58.0%; 1–80 oocysts per litre) and cysts in the influents of 49 WWTPs (98.0%; 2–14.400 cysts per litre). *Cryptosporidium* and *Giardia* were detected in the effluents from 32 (64.0%; 1–120 oocysts per litre) and 48 (96.0%; 2–6000 cysts per litre) WWTPs, respectively (Table 1).

In the selected area, it was observed that prevalence and the mean concentration (per litre) of *Giardia* cysts was

Table 1 – Prevalence, geometric mean, maximum (max) and minimum (min) numbers of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the influent and effluent samples from drinking water treatment plants (DWTPs) and wastewater treatment plants (WWTPs) in the 55 municipalities included in the study.

Plant	Cryptosporidium oocysts per litre						Giardia cysts per litre					
	Influent			Effluent			Influent			Effluent		
	Positive samples (%)	Mean	Max	Min	Positive samples (%)	Mean	Max	Min	Positive samples (%)	Mean	Max	Min
DWTP	21 (40.4%)	1.8	13	1	17 (32.7%)	1.2	4	1	22 (42.3%)	2.0	7	1
WWTP <sup>a</sup>	29 (58.0%)	18.8	80	1	32 (64.0%)	12.2	120	1	49 (98%)	1519.8	14,400	2

The prevalence and mean concentration (per litre) of *Giardia* cysts were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than those of *Cryptosporidium* oocysts in both the influent and the effluent samples.

The prevalence and mean concentration (per litre) of *Cryptosporidium* oocysts in both the influent and the effluent samples. The prevalence and mean concentration (per litre) of *Giardia* cysts were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than those of *Cryptosporidium* oocysts in both the influent and the effluent samples.

significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the mean concentration of *Cryptosporidium* oocysts in both the influents and the effluents from the WWTPs (Table 1). In addition, the concentration of (oo)cysts per litre of final effluent was not significantly different from the concentration of (oo)cysts per litre of influent in the DWTPs or WWTPs, and therefore it is possible that the treatments were ineffective at removing these enteropathogens from the treatment plants or that there were failures in the depuration systems (Table 1).

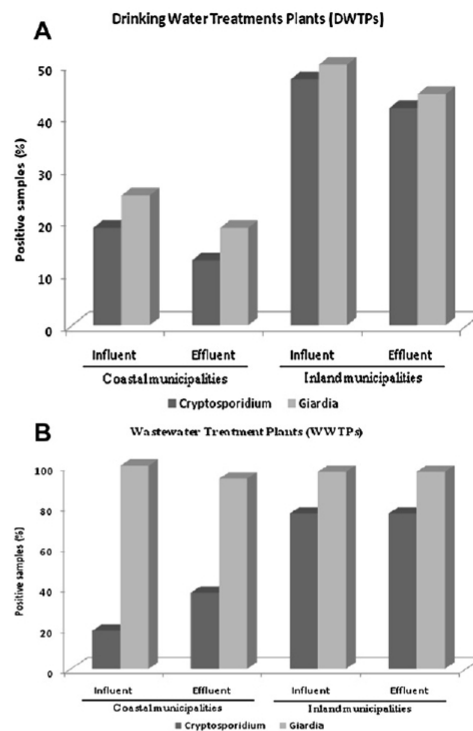
On the other hand, it was found that the coastal WWTP effluents were discharged directly into the sea, while the effluents from inland WWTPs were discharged directly into the river. The potential contamination of the study area (considering only the final effluent of WWTPs) was therefore between 1 and 120 *Cryptosporidium* oocysts per litre (mean 12.2) and between 2 and 6000 *Giardia* cysts per litre (mean 588.3) (see Table 1).

Examination of the results in relation to whether they applied to coastal or inland areas revealed that at all sampling points, the highest numbers of (oo)cysts were found in inland areas (Fig. 2A and B; Table 2). The prevalence and concentration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts were significantly higher ( $P < 0.05$ ) in the effluents from WWTPs in inland areas than in those from WWTPs in coastal areas (Fig. 2A and B; Table 2). Contamination of the rivers by both parasitic stages (1–120 oocysts per litre; 2–6000 cysts per litre) was therefore significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in the sea (1–7 oocysts per litre; 9–3440 cysts per litre). In inland recreational areas, many animals graze and the lands are fertilized, principally, with slurry from livestock. The levels of contamination by *Giardia* (21.3 cysts per litre) were also significantly higher ( $P < 0.05$ ) in inland areas than in coastal recreational areas (2.6 cysts per litre); however, the difference was not statistically significant for *Cryptosporidium* (8.9 oocysts per litre compared with 7 oocysts per litre).

#### 4. Discussion

The great majority of apparently water-related health problems are the result of microbial (bacteriological, viral, protozoan) contamination, and the enteropathogens *Cryptosporidium* and *Giardia* are especially important in this respect. Consideration of these faecal protozoans is of principal concern in setting health-based targets. Parasitological water quality often varies rapidly and over wide areas. Short-term peaks in concentrations of (oo)cysts may considerably increase the risk of cryptosporidiosis and giardiasis and may trigger waterborne outbreaks of these diseases. In fact, bathing in surface water could be associated with a significant risk (>1 per 10,000 individuals) of clinical cryptosporidiosis for an oocyst density of  $>5 \times 10^{-1}$  l (Coupe et al., 2006).

*Cryptosporidium* and *Giardia* enter the environment via faeces of land-dwellers (both human and non-human hosts). Proper management and treatment of human faeces and animal manures are essential to maintain clean and safe drinking and recreational water. The enormity of the problem of keeping water clean and safe may seem overwhelming when the volume of faeces that enters the environment is considered. Wastewater outfall and rainfall-initiated runoff



**Fig. 2 – Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the influent and effluent samples of drinking water treatment plants (A) and wastewater treatment plants (B) in the coastal and inland municipalities included in the study. The prevalence of *Giardia* was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the prevalence of *Cryptosporidium* in the influent and the effluent of WWTPs. The number of positive samples of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the influent and the effluent of DWTPs collected in inland municipalities was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in coastal municipalities.**

from urban, suburban and rural land can carry encysted stages of these pathogenic protozoa into untreated waters that are used for agricultural and recreational purposes and, in some locations, as sources of drinking water. Moreover, (oo) cysts can withstand normal water disinfection processes, and have been detected in high numbers in the final effluents of wastewater treatment plants (Fayer, 2004; Giangaspero et al., 2007; Ruecker et al., 2007; Cacciò and Sprong, 2010; Smith and Nichols, 2010).

The results of this study indicated that the selected area was highly contaminated with *Cryptosporidium* (range: 1–80 oocysts per litre) and *Giardia* (range: 1–14,400 cysts per litre), of which 90–95% were potentially infective to man and to domestic and wild ruminants. In outbreaks in Bradford (UK) and Milwaukee (USA), oocysts were detected in water samples at densities of less than 0.4 per litre (MacKenzie et al., 1994).



**Table 2 – Prevalence, geometric mean, maximum (max) and minimum (min) numbers of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the influent and effluent samples from drinking water treatment plants (DWTPs) and wastewater treatment plants (WWTPs) in the coastal municipalities (A) and in the inland municipalities (B) included in the study.**

Plant	<i>Cryptosporidium</i> oocysts per litre										<i>Giardia</i> cysts per litre									
	Influent					Effluent					Influent					Effluent				
	Positive samples (%)	Mean	Max	Min	Positive samples (%)	Mean	Max	Min	Positive samples (%)	Mean	Max	Min	Positive samples (%)	Mean	Max	Min	Positive samples (%)	Mean	Max	Min
A	DWTP	3 (18.7%)	1	1	1	2 (12.5%)	1	1	1	1	1.5	2	1	4 (25.0%)	763.6	4140	20	3 (18.7%)	1	1
	WWTP <sup>a,b</sup>	3 (18.7%)	38.3	80	15	6 (37.5%)	4.6	7	1	16 (100%)	1.5	2	1	16 (100%)	763.6	4140	20	15 (93.7%)	320.7	3440
B	DWTP	17 (47.2%)	2	13	1	15 (41.6%)	1	1	1	18 (50.0%)	2.1	7	1	33 (97.0%)	1886.4	14,400	2	16 (44.4%)	1.5	5
	WWTP <sup>a,b</sup>	26 (76.4%)	16.5	65	1	26 (76.4%)	14	120	1	33 (97.0%)	1886.4	14,400	2	33 (97.0%)	1886.4	14,400	2	33 (97.0%)	710	6000

a The prevalence and mean concentration (per litre) of *Giardia* cysts were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than those of *Cryptosporidium* oocysts per litre both in the influent and the effluent.

b The prevalence and concentration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the effluents of WWTPs collected in inland areas (B) were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in samples collected in coastal areas (A).

The range of concentrations of oocysts found in the present study was 2.5–200 times higher than the 0.4 oocysts per litre known to have caused outbreaks. These data revealed the risk of a possible outbreak if people were to accidentally drink river water while bathing, playing or swimming.

Analysis of the water treatment plant influents revealed the presence of oocysts in 21 DWTPs (40.4%; 1–13 oocysts per litre) and of cysts in 22 DWTPs (42.3%; 1–7 cysts per litre). In the effluents, *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts were detected in 17 DWTPs (32.7%; 1–4 oocysts per litre) and in 19 DWTPs (36.5%; 1–5 cysts per litre), respectively. The results corresponding to examination of the influent samples demonstrate that *Cryptosporidium* and *Giardia* infections are widespread throughout Galicia, with giardiasis being more widespread and occurring at greater intensity of infection than cryptosporidiosis. The presence of high mean concentrations of these protozoans in the final effluent is of public health concern. The infectious dose has been estimated to be as low as 10 (oo)cysts for *Cryptosporidium* (Fayer et al., 2000) and *Giardia* (Adam, 2001). During recent years, several waterborne outbreaks by *Cryptosporidium* and *Giardia* have been documented worldwide (Fayer, 2004; Giangaspero et al., 2007; Sunderland et al., 2007; Yoder and Beach, 2010). Nevertheless, in Spain very few epidemiological surveys have been carried out to establish the occurrence of these protozoa in drinking water, and no significant waterborne outbreaks of cryptosporidiosis or giardiasis have been reported (Montemayor et al., 2005; Gómez-Couso et al., 2005, 2006; Carmena et al., 2007), and probably the prevalence of these infections are underestimated. Moreover, although the European Union environmental legislation states that water intended for human consumption should not contain pathogenic organisms (Council Directive 98/83/EC), in Spain there are no specific regulations regarding tolerable limits of *Cryptosporidium* and *Giardia* in drinking water. Therefore, the basic and essential requirements to ensure the safety of drinking water are a “framework” for safe water, comprising health-based targets established by a competent health authority, adequate and properly managed systems (adequate infrastructure, proper monitoring and effective planning and management), and a system of independent surveillance. It is important that drinking water treatment authorities rethink the relevance of *Cryptosporidium* and *Giardia* contamination levels in drinking water and develop adequate countermeasures with the aim of protecting human and animal populations.

*Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts have been demonstrated in runoff from agricultural areas (Slifko et al., 2000; Fayer, 2004), and some outbreaks of cryptosporidiosis and giardiasis in humans have been attributed to contamination of drinking and bathing water with such effluents. The 55 municipalities included in the present study constitute an area of Galicia (NW Spain) characterised by a high density of domestic animals, predominantly cattle (livestock census: 191,214). The large proportion of animals and the large volume of faeces that they produce demonstrate the importance of dairy cattle as a potential source of environment contamination and as a possible reservoir of infectious parasites (Fayer, 2004; Castro-Hermida et al., 2002, 2006; Giangaspero et al., 2007). Moreover, most farms in the selected area had direct access to river water and there were no barriers (i.e., buffer

zones, vegetation) to prevent contamination of the water. In addition, manure is frequently washed away from these areas along well-defined drainage paths during rainfall events, and the cows typically have free access to nearby streams. In this scenario, both livestock manure and grazing cattle may contribute to contamination of the rivers with (oo)cysts. Therefore, in order to reduce the risk of human infection from cattle faeces, it is recommended that cattle farm owners apply good manure management practices. Direct access of cattle to watercourses should be controlled (e.g. off-site watering, fencing). Only decomposed manure should be used to fertilize vegetable and fruit crops. These steps should be taken seriously so as to curb contamination of parasites from cattle farms.

On the other hand, in the recreational areas, infective forms of *Cryptosporidium* and *Giardia* were detected in 16 (57.1%; 1–60 oocysts per litre) and 17 (60.7%; 1–160 cysts per litre) samples, respectively. This is similar to findings reported for other countries (Ono et al., 2001; Fayer, 2004; Briancesco and Bonadonna, 2005; Farizawati et al., 2005; Giovanni et al., 2006; Karanis et al., 2006). The high prevalence of (oo)cysts in the recreational river areas may be related to the fact that livestock farming, especially dairy cattle farming is predominant in the area. Nevertheless, uncontrolled contamination via wild animals cannot be discounted (Ruecker et al., 2007). Moreover, the study area includes wastewater treatment plants, which may contribute to the contamination of recreational river areas with both parasites. In this regard, it was observed that the highest concentrations were obtained in the WWTPs; specifically, oocysts were detected in 29 (58.0%; 1–80 oocysts per litre) and cysts in 49 WWTPs (98.0%; 2–14,400 cysts per litre) WWTP influents. *Cryptosporidium* and *Giardia* were detected in 32 (64.0%; 1–120 oocysts per litre) and 48 (96.0%; 2–6,000 cysts per litre) WWTP effluents, respectively. The occurrence in untreated wastewater and treated final effluents samples are higher than reported in other countries (Cacciò et al., 2003; Giovanni et al., 2006; Cheng et al., 2009; Chalmers et al., 2010; Smith and Nichols, 2010). Moreover, as the estimated parasite loads at these WWTPs were high, particularly for *Giardia*, parasite discharge in the effluent may also be considerable, and thereby represent a risk to human and animal health. Consequently, in recreational river areas, a close microbiological surveillance should be maintained as occasional peaks of contamination can be observed (Coupe et al., 2006).

The results for coastal and inland areas revealed that of all sampling points, the highest numbers of (oo)cysts were found in the inland areas. These results could be related to both the greater livestock activity, especially dairy cattle farming, in inland areas and the fact that the final effluents from the WWTPs in these areas are discharged into the same hydrographical basins where water for DWTPs is pumped. On the contrary, in the coastal areas there is a clear separation between zones where pumping for the DWTPs and discharging from the WWTPs take place.

Taking into account the characteristics of the selected area and the results obtained in this study, it is important to note that the prevention and control of cryptosporidiosis and giardiasis requires continued efforts to interrupt the transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* through water, food, and contact

with infected people or animals. This study lacks the molecular analysis and we do not know whether the parasites present in the samples are human pathogenic or not. The (oo)cysts could be from cattle source, but *Cryptosporidium ryanae*, *Cryptosporidium andersoni* and *Cryptosporidium bovis* to our present knowledge not human pathogenic species or the incidence of human infection is very rare. Similar situation with *G. duodenalis* assemblages C-D, E and F which often present in livestock and pet animals, but they are not human pathogens. Then, of particular importance is continued improvement and monitoring of drinking water treatment, molecular analysis, advances in the design, operation, and management of recreational water and wastewater reuse.

## 5. Conclusions

The findings of this study illustrate the need for better monitoring of water quality in order to systematize and standardize research to quantify *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts levels in recreational river areas, drinking water treatments plants and wastewater treatment plants in Galicia (NW, Spain). Finally, it is important that health authorities rethink the relevance of levels of contamination by *Cryptosporidium* and *Giardia* in waters (surface, drinking water, wastewater and reclaimed) and develop adequate countermeasures.

## Acknowledgements

The present study was financially supported by the Xunta de Galicia, through the consellería de Innovación e Industria (IN825 B2010-002), the Ministerio de Ciencia e Innovación, within the Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias (RTA2010-00003-00-00) and by the European Social Fund.

## REFERENCES

- Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14, 447–475.
- Briancesco, R., Bonadonna, L., 2005. An Italian study on *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater, fresh water and treated water. Environ. Monit. Assess. 104, 445–457.
- Bowman, D.D., Lucio-Forster, A., 2010. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: veterinary and public health importance. Exp. Parasitol. 124, 121–127.
- Cacciò, S.M., Sprong, H., 2010. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. Exp. Parasitol. 124, 107–112.
- Cacciò, S.M., De Giacomo, M., Aulicino, F.A., Pozio, E., 2003. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3393–3398.
- Campbell, A.T., Robertson, L.J., Smith, H.V., 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts, correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. Appl. Environ. Microbiol. 58, 3488–3493.
- Carmena, D., Aguinalde, X., Zigorraga, C., Fernández-Crespo, J.C., Ocio, J.A., 2007. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. J. Appl. Microbiol. 102, 619–629.

- Castro-Hermida, J.A., González-Losada, Y., Ares-Mazás, E., 2002. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Vet. Parasitol.* 106, 1–10.
- Castro-Hermida, J.A., Delafosse, A., Pors, I., Ares-Mazás, E., Chartier, C., 2005. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. *Vet. Rec.* 157, 623.
- Castro-Hermida, J.A., Carro-Corral, C., González-Warleta, M., Mezo, M., 2006. Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Galicia (NW, Spain). *J. Vet. Med. B.* 53, 244–246.
- Castro-Hermida, J.A., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia da Costa, J.M., Rumbo-Lorenzo, C., Mezo, M., 2007a. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitol. Res.* 101, 1443–1448.
- Castro-Hermida, J.A., González-Warleta, M., Mezo, M., 2007b. Natural infection by *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in sheep and goats in Galicia (NW Spain). *Small Rumin. Res.* 72, 96–100.
- Castro-Hermida, J.A., García-Presedo, I., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia da Costa, J.M., Mezo, M., 2008. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Water Res.* 42, 3528–3538.
- Castro-Hermida, J.A., García-Presedo, I., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia da Costa, J.M., Mezo, M., 2009. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: a health risk for humans and animals. *Water Res.* 43, 4133–4142.
- Chalmers, R.M., Robinson, G., Elwin, K., Hadfield, S.J., Thomas, E., Watkins, J., Casemore, D., Kay, D., 2010. Detection of *Cryptosporidium* species and sources of contamination with *Cryptosporidium hominis* during a waterborne outbreak in north west Wales. *J. Water Health* 8, 311–325.
- Cheng, H.W., Lucy, F.E., Graczyk, T.K., Broaders, M.A., Tamang, L., Connolly, M., 2009. Fate of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts during secondary wastewater treatments. *Parasitol. Res.* 105, 689–696.
- Coupe, C., Delabre, K., Pouillot, R., Houdart, S., Santillana-Hayat, M., Derouin, F., 2006. Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienersi* in surface water, including recreational areas: a one-year prospective study. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47, 351–359.
- Council Directive 92/43/EC, 1992. Council of the European Communities. Directive on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. *Off. J. Eur. Union* L206, 0007–0050.
- Council Directive 98/83/EC, 05/12/1998. On the quality of water intended for human consumption. *Off. J. Eur. Union* L330, 0032–0054.
- Cummins, E., Kennedy, R., Cormican, M., 2010. Quantitative risk assessment of *Cryptosporidium* in tap water in Ireland. *Sci. Total Environ.* 408, 740–753.
- Drinking Water Inspectorate, 2003. Drinking water for England and Wales – annual report 2003. <http://www.dwi.gov.uk/pubs/annrep03/mainindex.shtml> [Online].
- Farizawati, S., Lim, Y.A.L., Ahmad, R.A., Fatimah, C.T.N.I., Siti-Nor, Y., 2005. Contribution of cattle farms towards river contamination with *Giardia* oocysts and *Cryptosporidium* oocysts in SungaiLangat Basin. *Trop. Biomed.* 22, 89–98.
- Fayer, R., 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.* 126, 37–56.
- Fayer, R., 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124, 90–97.
- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30, 1305–1322.
- Feng, Y., 2010. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Exp. Parasitol.* 124, 128–137.
- Giangaspero, A., Berrilli, F., Brandonisio, O., 2007. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. *Parasitol. Res.* 101, 1169–1182.
- Giovanni, G.D., Betancourt, W.Q., Hernandez, J., Assadian, N.W., Flores Margez, J.P., Jaramillo Lopez, E., 2006. Investigation of potential zoonanthropotic transmission of cryptosporidiosis and giardiasis through agricultural use of reclaimed wastewater. *Int. J. Environ. Health Res.* 16, 405–418.
- Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Castro-Hermida, J.A., Ares-Mazás, E., 2005. *Giardia* in shellfish-farming areas: detection in mussels, river water and waste waters. *Vet. Parasitol.* 133, 13–18.
- Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Castro-Hermida, J.A., Ares-Mazás, E., 2006. *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. *J. Food Prot.* 69, 185–190.
- Graczyk, T., Sunderland, D., Awantang, G., Mashinski, Y., Lucy, F., Graczyk, Z., Chomicz, L., Breyse, P., 2010. Relationships among bather density, levels of human waterborne pathogens, and fecal coliform counts in marine recreational beach water. *Parasitol. Res.* doi:10.1007/s00436-010-1769-2.
- Health Canada, 2004. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Supporting Documentation – Protozoa: *Giardia* and *Cryptosporidium*. Water Quality and Health Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch. Health Canada, Ottawa, Ontario.
- Karanis, P., Sotiriadou, I., Kartashev, V., Kourenti, C., Tsvetkova, N., Stojanova, K., 2006. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environ. Res.* 102, 260–271.
- MacKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., Davis, J.P., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331, 161–167.
- Mason, B.W., Chalmers, R.M., Carnicer-Pont, D., Casemore, D.P., 2010. A *Cryptosporidium hominis* outbreak in north-west Wales associated with low oocyst counts in treated drinking water. *J. Water Health* 8, 299–310.
- McCuin, R.M., Clancy, J.L., 2003. Modifications to United States Environmental Protection Agency methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 267–274.
- Ministry of Health of New Zealand, 2005. Annual review of drinking water quality in New Zealand 2003. <http://www.moh.govt.nz/water> [Online].
- Montemayor, M., Valero, F., Cofre, J., Lucena, F., 2005. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1455–1462.
- Ono, K., Tsuji, H., Rai, S.H., Yamamoto, A., Masuda, K., Endo, T., Hotta, H., Kawamura, T., Uga, S., 2001. Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in western Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3832–3836.
- Ortega-Pierres, G., Smith, H.V., Cacciò, S.M., Thompson, R.C.A., 2009. New tools provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. *Trends Parasitol.* 25, 410–416.
- Pintar, K.D., Fazil, A., Pollari, F., Charron, D.F., Waltner-Toews, D., McEwen, S.A., 2010. A risk assessment model to evaluate the role of fecal contamination in recreational water on the incidence of cryptosporidiosis at the community level in Ontario. *Risk Anal.* 30, 49–64.



- Ralston, B.J., McAllister, T.A., Olson, M.E., 2003. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. *Vet. Parasitol.* 114, 113–122.
- Reynolds, K.A., Mena, K.D., Gerba, C.P., 2008. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 192, 117–158.
- Rose, J.B., Landeen, L.K., Riley, K.R., Gerba, C.P., 1989. Evaluation of immunofluorescence techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3189–3196.
- Ruecker, N.J., Braithwaite, S.L., Topp, E., Edge, T., Lapen, D.R., Wilkes, G., Robertson, W., Medeiros, D., Sensen, C.W., Neumann, N.F., 2007. Tracking host sources of *Cryptosporidium* spp. in raw water for improved health risk assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3945–3957.
- Santín, M., Trout, J.M., Fayer, R., 2009. Longitudinal study of *Giardia duodenalis* genotypes in dairy cows from birth to 2 years of age. *Vet. Parasitol.* 162, 40–45.
- Savioli, L., Smith, H., Thompson, A., 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'neglected diseases initiative'. *Trends Parasitol.* 22, 203–208.
- Slifko, T.R., Smith, H.V., Rose, J.B., 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int. J. Parasitol.* 30, 1379–1393.
- Smith, H.V., Cacciò, S.M., Cook, N., Nichols, R.A.B., Tait, A., 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet. Parasitol.* 149, 29–40.
- Smith, H.V., Nichols, R.A.B., 2010. *Cryptosporidium*: detection in water and food. *Exp. Parasitol.* 124, 61–79.
- Smith, R.P., Chalmers, R.M., Mueller-Doblies, D., Clifton-Hadley, F.A., Elwin, K., Watkins, J., Paiba, G.A., Hadfield, S.J., Giles, M., 2010. Investigation of farms linked to human patients with cryptosporidiosis in England and Wales. *Prev. Vet. Med.* 94, 9–17.
- Sunderland, D., Graczyk, T.K., Tamang, L., Breyse, P.N., 2007. Impact of bathers on levels *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts in recreational beach waters. *Water Res.* 41, 3483–3489.
- Thompson, R.C.A., 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.* 30, 1259–1267.
- Thompson, R.C.A., Palmer, C.S., O'Handley, R., 2008. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet. J.* 177, 18–25.
- Thompson, R.C.A., Smith, A., Lymbery, A.J., Averis, S., Morris, K.D., Wayne, A.F., 2010. *Giardia* in western Australian wildlife. *Vet. Parasitol.* doi:10.1016/j.vetpar.2010.02.012.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2001. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. EPA 821-R-01–025. Office of Ground Water and Drinking Water Technical Support Center, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2002. National primary drinking water regulations: long term 1 enhance surface water treatment rule, Final rule. *Fed. Reg.* 67, 1812.
- WBG (The World Bank Group), 2009. Millennium development goals: building a better world. Available at: <http://www.developmentgoals.org/>.
- WHO (World Health Organization), 2009. Health and the millennium development goals. Available at: <http://www.who.int/mdg/en>.
- Wilkes, G., Edge, T., Gannon, V., Jokinen, C., Lyautey, E., Medeiros, D., Neumann, N., Ruecker, N., Topp, E., Lapen, D.R., 2009. Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. *Water Res.* 43, 2209–2223.
- Wyatt, C.R., Riggs, M.W., Fayer, R., 2010. Cryptosporidiosis in neonatal calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26, 89–103.
- Yoder, J., Beach, M., 2010. *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. *Exp. Parasitol.* 124, 31–39.



## DISCUSIÓN



La calidad del agua de bebida es una cuestión de interés para la salud pública debido a que el agua puede transmitir enfermedades en países de todos los continentes. Como consecuencia existen unas tasas de morbilidad y mortalidad significativas debidas a enfermedades causadas por organismos presentes en la misma. Los agentes patógenos involucrados en la transmisión hídrica y que constituyen uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial, son los protozoos y en particular destacan *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* (Slifko y col., 2000; Fayer, 2004; Baldursson y Karanis, 2011).

La cryptosporidiosis y la giardiosis son enfermedades parasitarias con una notable repercusión económica en los rumiantes domésticos, especialmente en las ganaderías bovina y ovina, a lo que se debe añadir su interés sanitario puesto que actualmente se consideran parasitosis re-emergentes. Son zoonosis de transmisión fecal-oral producidas tras la ingestión de (oo)quistes excretados en las heces de hospedadores infectados. Aunque las infecciones pueden ocurrir de forma esporádica, son cada vez más frecuentes los brotes epidémicos, generalmente de transmisión hídrica, asociados a aguas superficiales y de la red de abastecimiento público, incluso filtradas y tratadas. La importancia de estos patógenos se ve agravada por dos circunstancias: la extraordinaria resistencia de las formas infectantes a los antisépticos y desinfectantes habitualmente empleados y la ausencia, en el caso de la cryptosporidiosis, de un tratamiento eficaz. Por tanto, el control se debe dirigir principalmente a las explotaciones ganaderas aunque también hacia los animales silvestres que pueden propiciar el mantenimiento, diseminación y perpetuación de ambas infecciones, incluso en ausencia de animales domésticos.

Por otra parte, debido a la enorme cantidad de formas parasitarias eliminadas por las personas enfermas y animales durante el período de patencia, la escasa capacidad de sedimentación de los (oo)quistes en pantanos y depósitos, las prácticas de abonado de los pastos con purines, a veces no convenientemente madurados y la resistencia a las condiciones ambientales de las formas infectantes, conlleva a que la presencia de *Cryptosporidium* spp. y de *G. duodenalis* sean más ubicuas cada día, y en consecuencia la necesidad de investigar las fuentes cuantitativas primarias de ambos parásitos en el ambiente. De esta forma, se podrían diseñar planes estratégicos para el control de ambas infecciones en poblaciones de riesgo, con el fin de reducir o minimizar los factores que conducen a la introducción, transmisión y extensión de estas zoonosis parasitarias. En definitiva, se debe disminuir en lo posible la transmisión y la contaminación del suelo y del agua, al tiempo que se modifican y optimizan los sistemas de depuración para eliminar a estos parásitos.

El primer grupo de trabajos –constituido por tres publicaciones– que se presenta en esta Tesis Doctoral, muestra datos de prevalencias e intensidades de infección de

*Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en animales domésticos –bovinos y ovinos– y silvestres –corzos y jabalíes– en diferentes zonas y estaciones del año en Galicia. En estos estudios, se ha valorado la contribución de estos animales a la contaminación de aguas superficiales por ambos protozoos. Los resultados obtenidos indican que las infecciones por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en ungulados domésticos y silvestres están ampliamente distribuidas en Galicia. Sin embargo, los datos de prevalencia mostrados por diversos autores son difíciles de comparar al variar, entre otros, parámetros como la edad del animal en el momento del muestreo, el número de muestras analizadas, la metodología aplicada y la presencia/ausencia de sintomatología.

El criterio establecido para la realización de los estudios de prevalencia de la cryptosporidiosis y de la giardiosis en animales domésticos y silvestres fue la selección de zonas con elevada actividad ganadera y de caza situadas en las principales cuencas hidrográficas y próximas a áreas recreativas, playas fluviales o captaciones de agua para consumo humano, de manera que se examinaron rumiantes domésticos de diferentes grupos de edad y estado fisiológico/productivo, así como todos los corzos y jabalíes abatidos durante la temporada de caza en las áreas seleccionadas; en consecuencia, los animales se analizaron independientemente de que tuviesen o no síntomas clínicos, y por tanto con diferentes niveles de riesgo para el padecimiento de ambas infecciones. Sin embargo, en estudios similares Wade y col. (2000) establecen el diseño del muestreo y el número de explotaciones basándose en datos de prevalencias esperadas de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* (entorno a un 25%) y en un número de granjas muestreadas (aproximadamente 100) de acuerdo con Leek y Fayer (1984), criterio conservador, en opinión de los propios autores, teniendo en cuenta que prevalencias más elevadas fueron obtenidas en estudios previos (Anderson y Hall, 1982).

Por otra parte, opinamos que el valor de prevalencia detectado en los animales analizados se encuentra infravalorado, teniendo en cuenta que es el resultado del análisis de una muestra fecal obtenida de cada animal. Así, diversos autores indican que los estudios de prevalencia de la cryptosporidiosis y de la giardiosis en rumiantes domésticos están subestimados como consecuencia de la variación del número de muestras examinadas (Quílez y col., 1996; Olson y col., 1997; Fayer y col., 1998a, 2000b; Ruest y col., 1998; Huetink y col., 2001; Geurden y col., 2008). De esta forma, cuando las heces de animales infectados naturalmente se analizan periódicamente y durante prolongados períodos de tiempo, las prevalencias de ambas infecciones pueden alcanzar el 100% (Xiao y Herd, 1994; Castro-Hermida y col., 2002b; Ralston y col., 2003; Robertson y col., 2010).

La edad de los animales es uno de los factores de riesgo más importante asociado a estas parasitosis, siendo los jóvenes más susceptibles que los adultos (Santín y Trout, 2008;

Geurden y Olson, 2011). En los trabajos realizados en esta Tesis Doctoral, se confirma que la cryptosporidiosis y la giardiosis afectan fundamentalmente a los animales más jóvenes, quienes pueden excretar grandes cantidades de (oo)quistes diariamente durante el curso de las parasitaciones representando, por tanto, una fuente de infección ya que ambas enfermedades pueden difundirse rápidamente de animal a animal. Sin embargo, en las explotaciones ganaderas bovinas y ovinas, los adultos son los principales portadores asintomáticos (Lorenzo-Lorenzo y col., 1993a; Xiao y col., 1994; Requejo-Fernández y col., 1995; Ortega-Mora y col., 1999b; Huetink y col., 2001; Castro-Hermida y col., 2007a,b). De hecho, en las granjas analizadas de ganado bovino hemos comprobado que aunque los animales mayores de un año fueron asintomáticos y sus prevalencias e intensidades de infección moderadas, constituyen la principal fuente de contaminación debido a su elevado número en la explotación (entorno al 90%) y al mayor volumen de heces que generan.

Algunos autores comprobaron la presencia de infecciones mixtas por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en ungulados domésticos y silvestres (Quílez y col., 1996; Wade y col., 2000; Hamnes y col., 2006a,b; Robertson y col., 2010). La aplicación de la técnica de IFD utilizando la prueba comercial (Aqua-Glo, Waterborne Inc., Nueva Orleans, LA, EEUU), que emplea un anticuerpo monoclonal específico frente a epitopos de la pared del ooquiste de *Cryptosporidium* spp. y del quiste de *G. duodenalis* marcado con isotiocianato de fluoresceína, ha permitido detectar infecciones mixtas por ambos enteropatógenos en todas las especies de animales analizadas así como cuantificar la excreción de las formas parasitarias.

Aunque diversos autores observan un incremento en las prevalencias de la cryptosporidiosis y de la giardiosis animal en ciertas estaciones del año, relacionándolo con épocas de lluvia o acumulación de partos, el efecto estacional sólo puede valorarse correctamente cuando el estudio se repite durante varios años consecutivos. De esta forma, la realización del estudio epidemiológico longitudinal en la cuenca hidrográfica del río Tambre durante tan solo un año, el hecho de que se hayan examinado bovinos de diferentes grupos de edad y estado fisiológico/productivo y la variación del número de muestras fecales recogidas durante las diferentes épocas del año, especialmente de los terneros recién nacidos, son factores limitantes para valorar correctamente las posibles fluctuaciones estacionales, por lo que los resultados deben ser juzgados prudentemente. En todas las estaciones del año, se comprobó que la prevalencia intrarrebaño de la giardiosis fue mayor que la de la cryptosporidiosis aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas infecciones. Además, hemos detectado un incremento en las prevalencias intrarrebaño de ambas parasitosis durante la primavera en relación con los valores obtenidos durante el verano, el otoño y el invierno. En esta última época del año, las prevalencias de ambas

enfermedades fueron significativamente más bajas que en la primavera. Atwill y col. (1999), al realizar un estudio durante siete meses, concluyen que el mes de mayo es de alto riesgo para el padecimiento de la cryptosporidiosis bovina, quizá debido a que los animales están más en contacto con la fuente de infección, se reduce la capacidad de resistencia a la misma o bien que las condiciones ambientales favorecen la transmisión. Por el contrario, en un estudio realizado por Wade y col. (2000) en 109 explotaciones bovinas lecheras en cinco regiones del sureste del Estado de Nueva York (Estados Unidos), no detectaron fluctuaciones estacionales para ambas enfermedades parasitarias.

La aplicación del método 1623 recomendado por la USEPA para la detección de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en muestras hídricas (USEPA, 2005), ha permitido demostrar la contaminación de las aguas por ambos enteropatógenos. Concretamente, en el estudio longitudinal que hemos llevado a cabo en el sistema de explotación hidrográfica del río Tambre, se ha confirmado la presencia de *Cryptosporidium* spp. en 62/116 (53,4%) muestras procedentes de 27/29 (93,1%) puntos y de *G. duodenalis* en 78/116 (67,2%) muestras recogidas en los 29/29 (100%) puntos seleccionados. Al igual que los resultados obtenidos en la ganadería bovina, hemos comprobado que en la primavera, coincidiendo con el incremento del pastoreo y el abonado de las tierras, se registraron las cifras de contaminación hídrica más altas tanto para *Cryptosporidium* spp. como para *G. duodenalis*. Así, en esta época del año se detectaron formas infectantes de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en las aguas superficiales del entorno de las explotaciones ganaderas en 26 (89,6%) y 27 (93,1%) muestras, respectivamente. Las concentraciones registradas oscilaron entre 2-1.200 OPL y 2-400 QPL, y no se observaron diferencias significativas entre ellas. Estos valores podrían estar relacionados con las elevadas excreciones de (oo)quistes detectadas en el ganado durante esta época del año. La valoración del efecto estacional sobre las concentraciones de formas parasitarias en aguas también ha sido investigada por numerosos autores (Isaac-Renton y col., 1996; Hashimoto y col., 2001; Cacciò y col., 2003; Montemayor y col., 2005.; Carmena y col., 2007).

Por otra parte, la contribución de los animales domésticos y silvestres a la contaminación de aguas superficiales por ambos protozoos está reconocida por diversos autores (Appelbee y col., 2005; Thompson y col., 2008; Castro-Hermida y col., 2009, 2011a,b; Budu-Amoako y col., 2012). Como se ha comentado, los resultados obtenidos en los trabajos realizados en esta Tesis Doctoral muestran una alta prevalencia e intensidad de parasitación por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en rumiantes domésticos. Los abundantes residuos generados en estas granjas son frecuentemente utilizados o eliminados sin tratamiento previo. De hecho, una práctica habitual en estos rebaños es usar los estiércoles y purines en la fertilización agrícola siendo el manejo y almacenamiento de estos residuos, en numerosas

ocasiones, inadecuado. Además, hemos observado que en algunas granjas los purines se aplican a los pastos o cultivos sin estar convenientemente madurados. Todos estos aspectos indican que tanto los estiércoles como los purines también podrían ser una relevante fuente de contaminación ambiental. La elevada pluviosidad característica de esta región asociada a ciertas prácticas ganaderas facilitan el arrastre de las formas infectantes de estos parásitos a los cauces de agua. Además, al ser *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* parásitos ubicuos que infectan a una amplia variedad de hospedadores vertebrados, ciertos animales silvestres pueden actuar como reservorios de la infección (Appelbee y col., 2005; Cacciò y col., 2005; Beck y col., 2011). En este sentido, hemos de comentar que el corzo (*Capreolus capreolus*) y el jabalí (*Sus scrofa*) son los principales ungulados silvestres que habitan en el entorno de las explotaciones ganaderas de Galicia, su población ha aumentado durante las últimas décadas y comparten en ocasiones áreas de pastoreo con el ganado. Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que la contribución de corzos y jabalíes a la diseminación de la cryptosporidiosis y de la giardiosis es poco relevante, al menos en las condiciones en que actualmente se mantienen ambas poblaciones cinegéticas en Galicia. Por tanto, las prevalencias y concentraciones parasitarias detectadas tanto a nivel de los rebaños como individuales demuestran la importancia del ganado (bovino y ovino) como fuente potencial de contaminación del ambiente y de transmisión a los animales salvajes (Fayer y col., 2000b; Castro-Hermida y col., 2006b,c) confirmando que la ganadería bovina, especialmente de aptitud lechera, es el principal reservorio de ambas infecciones en esta región. Estas circunstancias hacen suponer que la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas pueda llegar a ser muy elevada. Además, las repercusiones epidemiológicas de la contaminación del agua pueden adquirir enorme importancia ya que es un medio idóneo para la diseminación de las formas parasitarias y una sola fuente contaminada puede infectar a un gran número de hospedadores.

Diversos autores han identificado (oo)quistes de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en cuencas hidrográficas así como en aguas de escorrentía de áreas dedicadas a la agricultura (Slifko y col., 2000; Fayer, 2004; Smith y col., 2007; Castro-Hermida y col., 2009, 2010; Smith y Nichols, 2010). Como se ha indicado, en el estudio longitudinal llevado a cabo en el sistema hidrográfico del río Tambre, hemos comprobado que en el 93,1% y 100% de los puntos de muestreo –incluidas áreas recreativas y playas fluviales– se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *G. duodenalis*, respectivamente. Además, durante el seguimiento anual de la cuenca hidrográfica, las concentraciones medias de parásitos oscilaron entre 2-1.350 OPL y entre 2-722 QPL. Estudios epidemiológicos realizados por otros autores como consecuencia de brotes hídricos ocasionados por ambos enteropatógenos demostraron



también una amplia distribución de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en aguas superficiales (LeChevallier y col., 1991; Roach y col., 1993; Ong y col., 1996; Ono y col., 2001). Sin embargo, es difícil establecer comparaciones válidas entre los porcentajes e intensidades de contaminación debido a las distintas metodologías empleadas (Clancy y col., 1994), a los factores propios de las diferentes zonas geográficas analizadas y a los diversos períodos del año durante los que se realizaron los estudios (Hansen y Ongerth, 1991).

La utilización de técnicas basadas en la aplicación de colorantes vitales fluorogénicos (DAPI e IP) para detectar la viabilidad de las formas infectantes están ampliamente reconocidas (Campbell y col., 1992; Thiriat y col., 1998; Freire-Santos y col., 2000a; Méndez-Hermida y col., 2005a, 2007a; Robertson y Gjerde, 2007). Campbell y col. (1992) desarrollaron un método para valorar la viabilidad ooquistica basado en la inclusión/exclusión de los colorantes vitales fluorogénicos IP (membrana-impermeable) y DAPI (membrana-permeable). Además, Jenkins y col. (1997) y Thiriat y col. (1998) concluyeron que los ensayos con colorantes vitales son buenos indicadores de la permeabilidad de la pared (oo)quistica. Así, el colorante vital IP es un indicador válido de la integridad de las membranas, ya que solo atraviesa aquellas que presentan un cierto grado de deterioro (Chacka y col., 1995). En todas las muestras de aguas superficiales observamos un porcentaje medio de viabilidad y por tanto, de potencial infectividad, del 90,0% para *Cryptosporidium* spp. y del 95,0% para *G. duodenalis*.

La interpretación de los resultados obtenidos sería incompleta si no intentásemos identificar las especies y los genotipos de *Cryptosporidium* y *G. duodenalis* presentes en las muestras fecales e hídricas. En la mayoría de las ocasiones, los (oo)quistes de las distintas especies y genotipos no pueden ser diferenciados por su tamaño, forma e incluso características de tinción, siendo necesario recurrir a una metodología basada en la técnica de PCR para su identificación molecular (Monis y col., 2009; Smith y Nichols, 2010; Xiao, 2010). Los protocolos de PCR basados en amplificación y secuenciación de los genes 18S SSU ARNr (*Cryptosporidium* spp.) y  $\beta$ -giardina (*Giardia* spp.) son los más ampliamente utilizados y contrastados en la literatura científica para la identificación de especies y genotipos de estos protozoos en muestras fecales e hídricas, circunstancia por la que se seleccionaron estos protocolos para realizar los estudios moleculares que forman parte de esta Tesis Doctoral. Sin embargo, la aplicación de técnicas moleculares para analizar tanto muestras de heces como de aguas puede presentar problemas ante la existencia de sustancias potencialmente inhibidoras de la reacción, las cuáles pueden ser extraídas conjuntamente con el ADN del parásito, impidiendo su amplificación o reduciendo la sensibilidad del método (Tebbe y Vahjen, 1993; Yeates y col., 1997).

Además, la presencia en estas muestras de ciertos organismos puede ocasionar reacciones cruzadas y por lo tanto reducir la especificidad de la técnica (Xiao y col., 2000; Miller y col., 2005). Tal vez sean estos los motivos por los que no hemos conseguido identificar especies y genotipos de *Cryptosporidium* y *G. duodenalis* en todas las muestras fecales e hídricas analizadas.

Es necesario destacar que la metodología usada en los trabajos de biología molecular que hemos realizado con *Cryptosporidium* spp., no permite excluir la presencia de otras especies y genotipos presentes en las muestras fecales o hídricas. De hecho, la técnica de PCR basada en la amplificación del gen 18S SSU ARNr solo detecta la población más abundante. En este sentido, hemos de señalar que en el estudio epidemiológico transversal realizado en dos áreas de Galicia –costera e interior– únicamente se han identificado dos especies de *Cryptosporidium* –*C. andersoni* y *C. parvum*– en las muestras fecales procedentes de rumiantes domésticos –bovinos y ovinos– por lo que no podemos descartar la presencia de infecciones mixtas por otras especies y/o genotipos de *Cryptosporidium*. Así, Cama y col. (2006) y Feng y col. (2007b) han indicado que el predominio de las poblaciones de *C. parvum* en terneros neonatos con diarrea puede enmascarar la presencia de otras especies y genotipos.

En nuestro estudio, tanto en la zona costera como interior, solo se detectó *C. parvum* en terneros y corderos recién nacidos. La distribución de especies de *Cryptosporidium* detectada en animales de este grupo de edad (< 30 días) es similar a la descrita por numerosos autores que afirman que *C. parvum* es la especie fundamentalmente implicada en la etiología de la cryptosporidiosis neonatal bovina y ovina, mientras que la presencia de otras especies y genotipos de *Cryptosporidium*, por ejemplo, *C. bovis*, *C. hominis*, *C. ryanae*, *C. xiaoi* o el genotipo cervino de *C. parvum* (actualmente denominado *C. ubiquitum*), aunque han sido descritas en terneros y corderos lactantes, son muy poco frecuentes en animales tan jóvenes (McLauchlin y col., 2000; Chalmers y col., 2002, 2005; Ryan y col., 2005; Park y col., 2006; Goma y col., 2007; Navarro-i-Martínez y col., 2007; Plutzer y Karanis, 2007; Santín y col., 2007; Thompson y col., 2007; Brook y col., 2008, 2009; Geurden y col., 2008; Quílez y col., 2008b; Coklin y col., 2009; Fayer y Santín, 2009; Díaz y col., 2010a,b).

La distribución de las especies de *Cryptosporidium* en la ganadería bovina, tanto de aptitud cárnica como lechera, presenta un patrón estrechamente relacionado con la edad de los animales (Santín y col., 2004, 2008; Fayer y col., 2006b, 2007; Thompson y col., 2007; Feltus y col., 2008; Keshavarz y col., 2009). Según estos autores, *C. parvum* es la especie responsable de la cryptosporidiosis en terneros lactantes con edades comprendidas entre cinco días y dos meses, mientras que *C. bovis* y *C. ryanae* son las especies más frecuentemente identificadas

en terneros destetados y en novillas, cuyas edades pueden oscilar entre tres meses y dos años. En vacas mayores de dos años, la especie que predomina es *C. andersoni*. Fayer y col. (2007) indican que el porcentaje de animales con cryptosporidiosis causada por *C. parvum* se reduce desde un 85,0% en terneros recién nacidos hasta un 6,0% en animales mayores de dos meses, por lo que el ganado bovino adulto desempeñaría un papel poco relevante como reservorio zoonótico de la infección. Sin embargo, a diferencia de las observaciones realizadas por estos autores, en nuestro estudio detectamos *C. andersoni* y *C. parvum* en novillas y vacas. Por tanto, si tenemos en cuenta las prevalencias e intensidades de parasitación detectadas en estos animales, su elevado número en la explotación y el volumen de heces que generan junto con los sistemas de producción ganadera aplicados en Galicia y que ambas especies de *Cryptosporidium* tienen características zoonóticas, creemos que las novillas y las vacas, especialmente de aptitud lechera, son los principales reservorios de la cryptosporidiosis en esta región. Además, la relevancia de estos animales como fuente de contaminación ambiental, posiblemente es mayor en zonas del interior de Galicia, en las que hemos detectado prevalencias más altas de *C. parvum* en terneros, novillas y vacas en comparación con las halladas en la zona costera. Incluso, la diseminación de *C. parvum* en la zona interior se puede incrementar ya que también identificamos esta especie en el ganado ovino adulto. Este último resultado también difiere de lo observado por otros autores quienes identifican en ovejas adultas *C. bovis*, el genotipo cervino de *C. parvum* (*C. ubiquitum*) y de forma ocasional *C. suis*, *C. hominis* y *C. andersoni* (Ryan y col., 2005; Santín y col., 2007; Elwin y Chalmers, 2008; Geurden y col., 2008; Quílez y col., 2008a; Fayer y Santín, 2009; Sweeny y col., 2011; Paraud y Chartier, 2012).

Actualmente están reconocidos siete genotipos de *G. duodenalis*: A (subtipos A-I, A-II) y B responsables de rutas zoonóticas; C y D infectan principalmente a cánidos; E ha sido ampliamente descrito en artiodáctilos y el F se ha detectado fundamentalmente en el gato doméstico. Estos cuatro últimos, aunque los hospedadores principales son los animales, han sido identificados ocasionalmente en el hombre (Read y col., 2004; Gelanew y col., 2007; Leonhard y col., 2007; Wielinga y Thompson, 2007; Foronda y col., 2008; Traub y col., 2009). El genotipo G solo se ha reconocido en roedores (Feng y Xiao, 2011). En nuestro estudio, tanto en la zona costera como interior, se detectaron los genotipos A-I, B y E en los rumiantes domésticos analizados. Concretamente, la interpretación de los resultados obtenidos en el ganado bovino, independientemente de la edad y del estado fisiológico/productivo de los animales, ha puesto de manifiesto que los genotipos A-I y E son los únicos que infectan a estos rumiantes en Galicia.

Diversos autores indican que el genotipo E es el más frecuentemente identificado en el ganado bovino seguido del genotipo A (Mendonça y col., 2007; Santín y col., 2009; Dixon y col., 2011). Además, varios estudios llevados a cabo en Estados Unidos concluyen que los genotipos A y E pueden infectar a la ganadería bovina a cualquier edad (Trout y col., 2004-2007); no obstante, las prevalencias de ambos genotipos pueden disminuir a medida que aumenta la edad de los animales. Respecto a los subtipos de *G. duodenalis*, hemos identificado el A-I que es el que predomina en rumiantes domésticos (Feng y Xiao, 2011) aunque el subtipo A-II también ha sido reportado (Mendonça y col., 2007). Por tanto, la importancia de la ganadería bovina como fuente de contaminación ambiental, posiblemente es mayor en zonas del interior de Galicia en las que hemos detectado prevalencias más altas de los genotipos A-I y E en comparación con las halladas en la zona costera. Incluso, la diseminación de *G. duodenalis* en la zona interior de esta región se puede incrementar ya que también hemos detectado tanto en corderos recién nacidos como en ovejas mayoritariamente el genotipo E y en menor proporción el genotipo B. En el ganado ovino, diversos autores confirman que el genotipo E es el más frecuente en todos los grupos de edad (Ryan y col., 2005; Castro-Hermida y col., 2006b; Santín y col., 2007; Geurden y col., 2008; Yang y col., 2009; Gómez-Muñoz y col., 2009; Robertson y col., 2010; Sweeny y col., 2011). Asimismo, se ha descrito el genotipo A en corderos destetados (Ryan y col., 2005; Yang y col., 2009) y el genotipo B ha sido asociado con síntomas clínicos severos en animales entre 30 y 90 días de edad (Aloisio y col., 2006).

Por otra parte, para valorar adecuadamente la contribución de los animales a la contaminación de aguas superficiales por ambos protozoos, también es necesario caracterizar molecularmente los aislados de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* presentes en las aguas fluviales del entorno de las granjas. Así, en los diferentes estudios epidemiológicos realizados, hemos detectado en estas muestras hídricas las mismas especies y genotipos de *Cryptosporidium* (*C. andersoni* y *C. parvum*) y *G. duodenalis* (subtipo A-I, genotipo E) identificadas en los animales. Estos resultados confirman la importancia del efecto de la actividad ganadera, especialmente de origen bovino, sobre la contaminación de los ríos por ambos protozoos. Sin embargo, hemos observado que la contaminación de las cuencas hidrográficas gallegas no solo es de origen animal sino también puede ser de origen humano. De hecho, en aguas superficiales hemos identificado también una especie de *Cryptosporidium* (*C. hominis*) y un subtipo (A-II) de *G. duodenalis* que predominan en infecciones humanas y por tanto responsables de rutas de transmisión antroponóticas, lo que indica que también podría existir una posible fuente de contaminación humana. En este sentido, hemos comprobado que los efluentes de las estaciones depuradoras de agua residual vierten directamente a las

cuencas hidrográficas, lo que justificaría la presencia de aislados de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* de origen humano y también confirmaría la contribución de las EDARs a la contaminación de las aguas superficiales por estos patógenos. Sin embargo, a pesar de que las EDARs recogen aguas residuales domésticas y en algunos casos aguas pluviales, en nuestro estudio hemos detectado *C. andersoni* y los genotipos A-I y E de *G. duodenalis* en las depuradoras de la zona interior de Galicia –agrícola y con elevado censo ganadero– y localizadas en el entorno de las granjas, mientras que en las EDARs situadas en la zona costera –turística y con una alta densidad de población– identificamos mayoritariamente las especies y los genotipos –*C. hominis* y *G. duodenalis* genotipo A-II– más frecuentes en el hombre. Estos resultados probablemente reflejan una mayor contribución de los animales a la contaminación ambiental en la zona interior de Galicia, aunque esta circunstancia podría ser debida a prácticas agropecuarias inadecuadas o una gestión inapropiada de las aguas residuales procedentes de las explotaciones ganaderas, principalmente de los rebaños estabulados. Además, en municipios con baja densidad de población (< 5.000 habitantes), las aguas residuales de pequeñas industrias (mataderos) pueden estar conectados a la red de alcantarillado público, previa autorización de vertido a la autoridad correspondiente.

Por tanto, un elevado porcentaje de los (oo)quistes excretados por los hospedadores contaminarán las fuentes de agua facilitando la difusión de ambos parásitos. Las repercusiones epidemiológicas de la contaminación del agua derivan de: a) todos los hospedadores precisan de este medio para su supervivencia; b) las formas infectantes son capaces de resistir en el agua durante períodos prolongados de tiempo y c) el número de (oo)quistes necesarios para la infección es muy bajo tanto en los animales como en el hombre (Fayer, 2004; Smith y col., 2007; Reynolds y col., 2008). Teniendo en cuenta la presencia de elevadas concentraciones de formas parasitarias en el ambiente, el hecho de que la mayoría de las especies y genotipos identificados sean zoonóticos y que en Galicia los ríos se utilizan habitualmente para abastecer las ETAPs, los resultados obtenidos ponen de manifiesto el riesgo de potenciales brotes hídricos tanto desde la perspectiva de la sanidad animal como de la salud pública. En cuanto a la presencia de las formas infectantes en el ambiente debe señalarse que *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* tienen un ciclo biológico directo, en el que todas las especies infectadas actúan como hospedadores definitivos, contribuyendo a la contaminación ambiental con (oo)quistes, por lo que ambos protozoos son muy ubicuos (Fayer y col., 2000a; Slifko y col., 2000; Thompson, 2000). En este contexto, se precisa una gestión adecuada de las dispersiones de las heces animales y humanas, así como la necesidad de controlar la presencia de ambos protozoos en aquellos recursos hídricos utilizados con fines recreativos y en captaciones de agua para consumo humano o animal.

Una vez que se ha valorado la contribución de los animales domésticos y silvestres a la contaminación de aguas superficiales por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* y ante los interesantes resultados obtenidos en las muestras hídricas; a continuación, nos propusimos profundizar en el estudio del agua como vehículo de transmisión de ambos protozoos.

Así, se llevó a cabo un segundo grupo de trabajos, constituido también por tres publicaciones, con el fin de conocer el grado de contaminación de las aguas –residuales, potables y superficiales– con formas infectantes de ambos enteropatógenos en una cuenca hidrográfica y en distintas épocas del año en Galicia. Como estos estudios se efectuaron en depuradoras y potabilizadoras reales y no a nivel de plantas piloto, no es posible evaluar la eficacia de cada uno de los tratamientos aplicados en las EDARs y ETAPs; sin embargo, se ha estimado la eficiencia de las plantas existentes en la cuenca hidrográfica seleccionada sobre la reducción e inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *G. duodenalis*. Finalmente, se realizó un estudio más extenso en plantas depuradoras y potabilizadoras de 55 municipios gallegos.

La eliminación de los efluentes de las EDARs a cuencas hidrográficas o al mar necesita cada vez más garantías especiales debido al peligro que puede tener en sanidad animal y humana. Esta situación conlleva a que en los últimos años emerjan zoonosis de origen parasitario como la cryptosporidiosis y la giardiosis asociadas al agua y a los alimentos contaminados. Ante esta situación realmente preocupante, nos planteamos evaluar la concentración media por litro y la viabilidad de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *G. duodenalis* en los efluentes de 12 EDARs que vierten a un sistema de explotación hidrográfica en el que existen numerosas áreas recreativas y zonas de captación de abastecimiento a estaciones de tratamiento de agua potable.

Se detectó la presencia de (oo)quistes de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en el afluente y en el efluente de todas las depuradoras analizadas (100%). La concentración media por litro de las formas infectantes detectadas tanto en el agua de entrada como de salida fue más elevada que la observada en otros países (Bukhari y col., 1997; Cacciò y col., 2003; Robertson y col., 2006b; Lim y col., 2007; Zhang y col., 2008; Graczyk y col., 2009).

Los resultados obtenidos en las aguas residuales domésticas no tratadas indican que las infecciones por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* están ampliamente distribuidas en Galicia siendo, posiblemente, la giardiosis más prevalente que la cryptosporidiosis en la población. Estos datos son similares a los obtenidos en diferentes estudios epidemiológicos (Di Giovanni y col., 2006; Robertson y col., 2006b; Lim y col., 2007). La legislación sobre notificación de casos de cryptosporidiosis y giardiosis en el hombre varía según los países; por ejemplo, estas enfermedades son de declaración obligatoria en Estados Unidos, mientras que



en los países de la Unión Europea solo en el Reino Unido su declaración es obligatoria cuando se considera que ambas parasitosis han sido transmitidas por agua o alimentos. Además, en el Reino Unido existe una regulación estricta que establece que los niños afectados no deben asistir a guarderías o colegios hasta 48 horas después de haber remitido el cuadro diarreico, mismo período de tiempo que deben respetar los manipuladores de alimentos y cuidadores de pacientes altamente susceptibles a la infección (Davies y Chalmers, 2009; DWI, 2010).

En España, solo en algunas comunidades autónomas como Andalucía, se incluye la cryptosporidiosis en la lista de enfermedades de declaración obligatoria (BOJA, núm. 4, de 8 de enero de 2009). No obstante, ambas parasitosis están sujetas a vigilancia epidemiológica en nuestro país (Centro Nacional de Epidemiología, 2008, 2011). De hecho, la información extraída de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Economía y Competitividad muestra que en el año 2009 se comunicaron 307 casos de cryptosporidiosis frente a 867 casos de giardiosis (Centro Nacional de Epidemiología, 2009). Además, en el último informe anual de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, se destaca que el número de casos declarados tanto de cryptosporidiosis como de giardiosis, al Sistema de Información Microbiológica, ha ido aumentando progresivamente desde el año 2005 en niños menores de 10 años (Centro Nacional de Epidemiología, 2011). Por tanto, creemos necesario potenciar el control de ambas parasitosis, promoviendo tanto su declaración a través del Sistema de Información Microbiológica como su investigación en brotes diarreicos de etiología desconocida. Sería conveniente, también, la coordinación entre las autoridades responsables para vigilar la presencia de estos parásitos en la red de abastecimiento de aguas y en zonas recreativas.

No obstante, el número de formas parasitarias en el afluente dependerá del tamaño de la población equivalente y de la prevalencia de la cryptosporidiosis y la giardiosis en dicho núcleo poblacional (Smith y Rose, 1990) así, cuanto mayor sea el tamaño de la población mayor será la probabilidad de que se incluya una persona infectada (Robertson y col., 2006b; Lim y col., 2007). Sin embargo, en este estudio no se observó una relación directa entre la población equivalente y la concentración media de las formas infectantes en el afluente. Esto puede ser debido tanto al tipo de instalación como a la ubicación de algunas EDARs. De hecho, se ha observado que las pequeñas instalaciones de depuración, especialmente las que utilizan como tratamiento secundario filtros percoladores o lagunas aireadas, no están adecuadamente protegidas por lo que es posible el acceso de animales a estas depuradoras. Concretamente, se ha comprobado que las EDARs anteriormente citadas pertenecían a municipios altamente ganaderos, especialmente de ganado bovino, con abundantes zonas de pastoreo y diversos cotos de caza; por lo que no existía un control sobre la contaminación a

través de estos animales. Como hemos comentado, también se ha observado que en algunos núcleos poblacionales (< 5.000 habitantes) a las aguas residuales urbanas, se están incorporando cantidades progresivamente crecientes de aguas residuales procedentes de pequeñas industrias agroalimentarias o mataderos, lo que conlleva mayores dificultades para su depuración.

La determinación de las especies y genotipos de estos enteropatógenos, mediante estudios de biología molecular, ayuda a la identificación del origen de los (oo)quistes de *Cryptosporidium* spp. y de *G. duodenalis* que contribuyen a la contaminación ambiental. No obstante, la interpretación de los datos moleculares en muestras de agua debe realizarse con cautela ya que no existe una relación directa entre el hospedador y la muestra analizada. Así, en estudios llevados a cabo para determinar la especificidad del hospedador de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* ha existido siempre una relación directa entre el hospedador objeto de estudio y la muestra analizada (Perz y Le Blancq, 2001; Ryan y col., 2003; Zhou y col., 2004a; Castro-Hermida y col., 2006a,b). *C. hominis* y *G. duodenalis* (subtipo A-II), responsables principalmente de rutas de transmisión antroponóticas, se detectaron en el afluente de las EDARs 1 y 7, lo que sugiere que la mayoría de los (oo)quistes detectados en estas estaciones de tratamiento de agua residual proceden de infecciones de origen humano.

En las restantes depuradoras, la existencia de una única fuente de infección no puede definirse tan claramente. Así, en las EDARs 4, 5 y 6 se detectó *C. hominis*, y no solo se identificó *G. duodenalis* (subtipo A-I) sino que también se detectó el genotipo E, responsable de infecciones en artiodáctilos. En estos casos, en los que se detectan las especies, genotipos o subtipos responsables de las vías de transmisión antroponótica y zoonótica, es posible que exista un mayor predominio de especies de origen animal o bien de origen humano en determinadas áreas. En las EDARs 9, 3 y 8, se detectó *C. andersoni* que infecta el abomaso del ganado bovino juvenil y adulto (Lindsay y col., 2000) y *G. duodenalis* (subtipo A-II; subtipo A-II + genotipo E), en consecuencia, es posible que existan numerosos casos de cryptosporidiosis bovina y de giardiosis humana en las áreas de influencia de estas plantas de tratamiento.

Por tanto, la interpretación de los resultados moleculares obtenidos en los afluentes ofrece una información global sobre el estado de ambas infecciones en la zona de influencia de las depuradoras; incluso en algunos casos, esta información puede ser muy valiosa ya que las muestras analizadas en el agua de entrada proceden tanto de hospedadores sintomáticos como asintomáticos. No obstante, como se ha comentado anteriormente, en numerosos casos es muy difícil identificar claramente el/los hospedador/es infectados. Por ejemplo, en las EDARs 2, 10, 11 y 12 se detectó *C. parvum* y *G. duodenalis* (subtipo A-I y genotipo E); por lo

que, se confirma la presencia de casos de cryptosporidiosis y giardiosis en la zona de influencia de estas cuatro EDARs; sin embargo, no es posible identificar con exactitud el/los hospedador/es infectados.

La aplicación de los colorantes vitales fluorogénicos (DAPI e IP) permitió determinar individualmente la viabilidad de cada una de las formas parasitarias detectadas. Así, comprobamos que las concentraciones de *Cryptosporidium* spp. (2-390 OPL) y *G. duodenalis* (79-2.469 QPL) en los efluentes de las estaciones depuradoras pueden representar un importante riesgo para la salud humana y animal ya que se observaron unos porcentajes de viabilidad del 87,0% y 90,0%, respectivamente y por lo tanto potencialmente infectantes.

Se ha comprobado que los efluentes de todas las EDARs que formaron parte del estudio vierten directamente a la cuenca hidrográfica; en la que no solo existen áreas recreativas y zonas de captación de abastecimiento a ETAPs sino que además, el río principal desemboca en un estuario donde se cultivan moluscos bivalvos de interés comercial. Estudios previos han mostrado prevalencias elevadas de *Cryptosporidium* spp. (29,3%) y *G. duodenalis* (41,8%) en moluscos bivalvos de interés comercial y cultivados en diversos estuarios de Galicia (Gómez-Couso y col., 2005, 2006a). Además, diversos autores comprobaron la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *G. duodenalis* en aguas costeras y la ineficacia de algunos tratamientos terciarios –cloración y ozonización– en la inactivación de ambos parásitos (Korich y col., 1990; Johnson y col., 1995; Smith y Grimason, 2003). Incluso, en un interesante estudio realizado por Gómez-Couso y col. (2005) indican que el agua marina utilizada para depurar moluscos bivalvos de interés comercial puede ser responsable de la contaminación de los mismos en la planta depuradora.

Por otra parte, las concentraciones elevadas de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* detectadas en los efluentes de las EDARs podrían atribuirse, entre otras causas, al transporte de las formas infectantes a través de la línea de agua. Se ha comprobado que los (oo)quistes sedimentan muy lentamente (Brookes y col., 2005; Searcy y col., 2005; Dai y Boll, 2006), por tanto, las velocidades a las que se somete el cauce de agua residual durante los procesos de tratamiento influirán en la eliminación de ambos enteropatógenos. Así, algunas depuradoras disminuyen la velocidad del agua para producir la sedimentación de gravas y arenas; además, los tiempos de retención aplicados en la decantación primaria son muy variables de unas EDARs a otras, y los sistemas de aireación utilizados durante el tratamiento secundario pueden favorecer la resuspensión de los (oo)quistes facilitando su salida hacia el efluente. Estas observaciones podrían justificar que en algunas EDARs (1, 3, 8 y 12) la presencia de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* fuese mayor en el efluente que en el afluente. Los resultados obtenidos de caracterización molecular de ambos enteropatógenos fueron similares

tanto a la salida como a la entrada de la estación depuradora, excepto en las EDARs 2, 12 y 3, 8 en las que se detectaron *C. hominis* vs *C. parvum* y *C. parvum* vs *C. andersoni*, respectivamente. Las especies de *Cryptosporidium* identificadas en estos efluentes podrían atribuirse a su mayor concentración o simplemente a un proceso aleatorio.

Se observó que en la primavera y en el verano la presencia de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*, tanto en el afluente como en el efluente, fue mayor que en el otoño e invierno. Aunque la estacionalidad, ha sido indicada por algunos autores (Isaac-Renton y col., 1996; Cacciò y col., 2003; Montemayor y col., 2005; Carmena y col., 2007; Cheng y col., 2009), no ha sido confirmada por otros (Hashimoto y col., 2001; Robertson y Gjerde, 2001a). En el presente estudio, el incremento de las formas parasitarias detectadas en la primavera y en el verano podría ser debido a diversas actividades propias de estas épocas del año, por ejemplo, fertilización de los pastos con purines, pastoreo o turismo.

El tipo de proceso de tratamiento primario, secundario y terciario condiciona la reducción de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*. En este estudio, se comprobó que los porcentajes de eliminación de (oo)quistes oscilaron entre 19,0%-87,5% para *Cryptosporidium* spp. y entre 2,5%-91,5% para *G. duodenalis*. Estos resultados son similares a los descritos por algunos autores (Cacciò y col., 2003; Montemayor y col., 2005; Robertson y col., 2006b; Lim y col., 2007). Sin embargo, estas estimaciones serán interpretadas con precaución, ya que a pesar de obtener retenciones del 87,5% y del 91,5%, las formas parasitarias que se eliminan a la cuenca hidrográfica son viables, potencialmente infectantes y en cantidad suficiente como para infectar a un hospedador; en consecuencia, estos efluentes representan un riesgo para la salud animal y humana. De hecho, Villacorta-Martínez de Maturana y col. (1992) realizaron una simulación en el laboratorio sobre la retención de ooquistes de *C. parvum* en aguas residuales mediante el tratamiento con fangos activados, obteniendo un porcentaje de retención del 84,0%; no obstante, el 16,0% de los ooquistes recuperados fueron suficientes para desarrollar la infección en ratones neonatales Swiss CD-1.

Los procesos de pretratamiento y tratamiento primario no eliminan significativamente las formas infectantes de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* (Casson y col., 1990; Robertson y col., 2000; Zhang y col., 2008; Fu y col., 2010). Sin embargo, diversos autores han confirmado que los tratamientos secundarios y terciarios pueden llegar a producir porcentajes de reducción en torno al 90,0% para *G. duodenalis* mientras que para *Cryptosporidium* spp. estos valores son más bajos y muy variables (Cacciò y col., 2003; Robertson y col., 2006b; Graczyk y col., 2007; Lim y col., 2007; Cheng y col., 2009). En nuestro trabajo, los porcentajes de retención son similares a los mostrados por estos autores aunque en este caso, posiblemente haya existido un mayor efecto del tratamiento secundario que terciario.

Las aguas residuales depuradas representan una importante fuente de transmisión de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en Galicia. Se ha observado que mantener un proceso de depuración constante es muy difícil debido a la climatología; al exceso de población en zonas turísticas y en determinadas épocas del año, ya que algunas depuradoras no están adecuadamente dimensionadas; la situación de algunas EDARs en lugares donde puede existir contaminación incontrolada; un mantenimiento inadecuado; o bien, la existencia de redes de alcantarillado y colectores defectuosos, con aportación de aguas de escorrentía que incrementan notablemente el caudal y los costes de explotación (especialmente en los bombeos). En las zonas costeras este problema se agrava por la entrada de agua de mar y las consiguientes repercusiones en los procesos biológicos.

Por tanto, los efluentes de las EDARs que vierten directamente a los ríos o al mar deben presentar unos niveles bajos de contaminación química y/o microbiológica, de forma que no supongan un problema para la salud de los animales y del hombre. A este respecto, solo en Estados Unidos, Reino Unido, Australia, Canadá y Nueva Zelanda existe una reglamentación sobre la presencia de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en aguas superficiales. Con excepción del Reino Unido, en la Unión Europea no existe ninguna legislación que regule la vigilancia y el control de ambos parásitos en aguas superficiales, a pesar de la existencia de numerosos estudios que evidencian la importancia de considerar su presencia en este tipo de aguas (Rose, 1997; Cacciò y col., 2003; Castro-Hermida y col., 2010). En consecuencia, es necesario que las autoridades sanitarias, por una parte, establezcan normas más rigurosas para evitar la eliminación de aguas residuales contaminadas por estos protozoos y por otra, elaboren planes de control integrales para *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en los efluentes con el fin de proteger la salud animal y humana.

Paralelamente, hemos determinado la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *G. duodenalis* en el afluente y en el efluente de 16 ETAPs ubicadas en el mismo sistema de explotación hidrográfica que las EDARs analizadas. Al igual que en el estudio anterior, se llevó a cabo un seguimiento anual de las ETAPs en el que se estimó la eficiencia de las potabilizadoras en la reducción e inactivación de las formas infectantes de ambos protozoos y también se identificaron las especies y los genotipos de ambos parásitos en el agua de entrada y salida de estas plantas.

A lo largo del año, se detectó la presencia de *Cryptosporidium* spp. en el afluente y en el efluente de 14/16 (87,5%) y 12/16 (75,0%) ETAPs, respectivamente; mientras que se identificaron quistes de *G. duodenalis* en el agua de entrada y de salida en todas las potabilizadoras analizadas 16/16 (100%). Además, al considerar los afluentes de las 16 ETAPs, los valores obtenidos para *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* oscilaron entre 0-10,5 OPL y

1-12,8 QPL, respectivamente. En los efluentes las concentraciones obtenidas para *Cryptosporidium* spp. estuvieron comprendidas entre 0-3 OPL mientras que para *G. duodenalis* oscilaron entre 0,5-4 QPL. Estos resultados son ligeramente más altos que los hallados en otras zonas de España e incluso en otros países (Lechevallier y col., 1991; Briancesco y Bonadonna, 2005; Karanis y col., 2006; Carmena y col., 2007).

Los datos que hemos obtenido en los afluentes podrían explicarse por las altas concentraciones medias de *Cryptosporidium* spp. (2-390 OPL) y *G. duodenalis* (79-2.469 QPL) detectadas en los efluentes de las 12 EDARs. La eliminación directamente a la cuenca hidrográfica de estas aguas residuales contribuye significativamente a la contaminación de la misma por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* incluso esta contribución podría ser mayor que la producida por los animales domésticos y silvestres aún tratándose de una cuenca fluvial altamente ganadera. Además, observamos que solo en una ETAP el agua de entrada procedía de un manantial, mientras que en las 15 restantes las captaciones estaban localizadas en la cuenca, bombeando el agua directamente desde los ríos hacia la planta potabilizadora.

Las concentraciones detectadas en el agua apta para consumo ponen de manifiesto el riesgo de potenciales brotes hídricos, causados por ambos parásitos, en la población. De hecho, la dosis infectante de *C. parvum* inicialmente establecida en voluntarios humanos sanos fue de un valor medio de 132 ooquistes (Dupont y col., 1995). Sin embargo, en algunos casos se consiguió establecer la infección con dosis de 30 ooquistes, mientras que en otros estudios la dosis infectante se estableció en 82 ooquistes, observándose una gran variabilidad en la virulencia en función de los distintos aislados de *C. parvum* utilizados (Okhuysen y col., 1999; Fayer y col., 2000a). Además, extrapolaciones realizadas a partir del brote hídrico de Milwaukee (Estados Unidos) sugieren que la dosis para ciertos individuos puede variar entre 1-10 ooquistes (Newman y col., 1994; Rose, 1997; Eisenberg y col., 1998). La dosis infectante para *G. duodenalis* se estimó en 19-50 quistes para personas inmunocompetentes (Adam, 2001).

Se han descrito importantes brotes hídricos causados tanto por *Cryptosporidium* spp. como por *G. duodenalis*. Sin duda, el mayor brote de cryptosporidiosis que se ha documentado ocurrió en Milwaukee (Estados Unidos) en el año 1993 y afectó aproximadamente a 403.000 personas (Mac Kenzie y col., 1994). También se ha producido un brote de giardiosis importante en Bergen (Noruega) en el año 2004 y que afectó a 48.000 personas (Nygård y col., 2006). Durante los últimos años, se han documentado varios casos de cryptosporidiosis y de giardiosis debidos a la contaminación del agua de bebida (Fayer, 2004; Giangaspero y col., 2007; Reynolds y col., 2008; Mason y col., 2010; Yoder y Beach, 2010). En España, los estudios epidemiológicos que se han llevado a cabo han sido para determinar la presencia de



estos protozoos en el agua potable; sin embargo, apenas se han publicado brotes hídricos (Rodríguez-Salinas y col., 2000; Gómez-Couso y col., 2004b, 2005, 2006a; Montemayor y col., 2005; Carmena y col., 2007; Castro-Hermida y col., 2008b, 2011a; Navarro-i-Martínez y col., 2011).

Si exceptuamos los países en vías de desarrollo en los que la cryptosporidiosis y la giardiosis podría considerarse endémica, en los países industrializados los brotes hídricos de estas enfermedades, generalmente, son debidos a fallos en los sistemas de tratamiento y/o distribución del agua potable, a la aplicación inadecuada de los tratamientos en las potabilizadoras o a la contaminación fecal de las aguas en áreas recreativas (Betancourt y Rose, 2004; Karanis y col., 2006; Sunderland y col., 2007; Assavasilavasukul y col., 2008; Keegan y col., 2008; Cummins y col., 2010). De hecho, la causa del brote de cryptosporidiosis que ocurrió en Milwaukee (Estados Unidos) fue debida a la contaminación del lago Michigan que abastecía a una de las plantas de potabilización de agua de dicha ciudad y principalmente, a un deficiente tratamiento en la ETAP (Mac Kenzie y col., 1994). Al principio se pensó que las causas del brote habían sido las intensas precipitaciones que tuvieron lugar en la zona y el elevado censo de ganado bovino existente en las inmediaciones del lago; sin embargo, el análisis molecular de las muestras fecales de los pacientes afectados confirmó la presencia de *C. hominis*, sugiriendo que la contaminación tuvo un origen humano (Peng y col., 1997). Diversos autores indican que muchos de los brotes hídricos causados por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* se produjeron por fallos en el funcionamiento de las ETAPs (Mac Kenzie y col., 1994; Fayer, 2004; Gómez-Couso y col., 2004b; Nygård y col., 2006; Yoder y Beach, 2010).

La mayoría de los trabajos publicados sobre evaluación de la eficacia de los tratamientos convencionales aplicados en una ETAP (coagulación, floculación, sedimentación, filtración y desinfección) se realizaron a escala de planta piloto o en el laboratorio; sin embargo, son muy pocos los estudios que se han llevado a cabo en plantas reales (Betancourt y Rose, 2004; Assavasilavasukul y col., 2008; Keegan y col., 2008; Cummins y col., 2010). De hecho, a nivel de planta piloto se ha demostrado que es posible la eliminación de ambos enteropatógenos en todas las etapas de tratamiento; no obstante, los autores indicaron que el éxito del proceso de potabilización depende en gran medida de la eficacia de los procesos de coagulación, floculación y sedimentación (Betancourt y Rose, 2004). En estos trabajos se demuestra que los tratamientos pueden ser altamente efectivos en la inactivación de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y de los quistes de *G. duodenalis*. Sin embargo, en nuestros estudios, al igual que los realizados en las EDARs, no se pretende evaluar la eficacia de los tratamientos sino que se ha tratado de valorar la eficiencia de las plantas en la reducción e inactivación de las formas infectantes de ambos protozoos. En este sentido, hemos de señalar

que de las 16 ETAPs que formaron parte del estudio longitudinal, en tres plantas se aplicaron procesos de sedimentación seguidos de un tratamiento de desinfección con cloro; en seis ETAPs se llevaron a cabo tratamientos de filtración, sedimentación y cloración; mientras que en las siete ETAPs restantes se realizaron todos los procedimientos convencionales. En estas últimas potabilizadoras se han observado las reducciones más bajas aunque no hemos detectado diferencias estadísticamente significativas respecto a las halladas en las otras plantas. Este resultado podría ser debido a que en estas ETAPs –más grandes y complejas– mantener un funcionamiento adecuado es más difícil que en las pequeñas.

Aunque prácticamente las plantas que realizan todos los procedimientos convencionales están automatizadas y es posible grabar y visualizar a tiempo real los diferentes procesos de tratamiento, en muchos casos los problemas pueden ser más graves y difíciles de resolver que en otras ETAPs más sencillas. Generalmente, las plantas potabilizadoras grandes, construidas por empresas especializadas, presentan una tendencia a estar demasiado equipadas y totalmente automatizadas, así como a la inclusión de piezas complejas en las estructuras de alimentación y recolección, lo que encarece el mantenimiento de las mismas. Hemos comprobado que en algunas de las potabilizadoras visitadas, existía falta de mantenimiento y esto provoca que los equipos electromecánicos y de automatización fallen, lo que puede crear graves problemas en el/los proceso/s. Este tipo de reparaciones suelen ser muy costosas y requieren de personal especializado por lo que en ocasiones no se reparan correctamente. No obstante, también hemos observado que en algunas ETAPs si los equipos de automatización fallaban, existía la posibilidad de operar manualmente; sin embargo, la falta de mantenimiento provoca que la planta deje de ser automática y potabilizará el agua sin la calidad adecuada. Estas observaciones también se podrían añadir a las anteriormente comentadas respecto al funcionamiento de algunas de las EDARs analizadas, ya que en varias depuradoras los procesos de tratamiento estaban totalmente automatizados; sin embargo, los altos costes de mantenimiento han dado lugar a que en diversas EDARs el funcionamiento sea irregular y por tanto, se justificaría la ineficiencia de algunas plantas –ETAPs y EDARs– en la reducción e inactivación de las formas infectantes de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*.

Por otra parte, en los afluentes de las ETAPs, se identificaron las mismas especies y genotipos de *Cryptosporidium* y *G. duodenalis* que las detectadas en los efluentes de las EDARs, es decir, *C. andersoni*, *C. hominis* y *C. parvum* así como los genotipos A-I, A-II y E de *G. duodenalis*, lo que confirma la importancia de estos efluentes en la contaminación de las aguas superficiales por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*. Al igual que hemos observado en las EDARs, también hemos detectado las mayores concentraciones de formas parasitarias de ambos patógenos durante la primavera y el verano respecto al otoño e invierno. Este

incremento podría ser debido no solo a diversas actividades agropecuarias y turísticas, propias de estas épocas del año, sino que podría confirmar la contribución significativa de las aguas residuales depuradas a la contaminación de los ríos por estos parásitos. Además, los resultados obtenidos tras la realización de la técnica de inclusión/exclusión de colorantes vitales fluorogénicos, en las muestras recogidas de los efluentes de las plantas potabilizadoras, mostraron un porcentaje medio de viabilidad del 85,0% para *Cryptosporidium* spp. y del 93,0% para *G. duodenalis*, por lo que estos datos confirman que las formas parasitarias eliminadas en estas plantas pueden representar un importante riesgo para la salud animal y humana. En consecuencia, es necesario elaborar una legislación, hasta la fecha inexistente en España, de vigilancia y control de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en las plantas potabilizadoras.

Finalmente, hemos llevado a cabo un estudio transversal en 55 municipios gallegos con el fin de determinar la presencia de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en los afluentes y efluentes de EDARs (n=50) y ETAPs (n=52), así como en ARFs (n=28). Los resultados obtenidos en este trabajo, han sido similares a los observados en los estudios longitudinales realizados en la cuenca hidrográfica del Tambre y también se pone de manifiesto el alto grado de contaminación de las aguas con formas infectantes de ambos enteropatógenos en Galicia. Hemos observado, además, que los niveles de contaminación por *G. duodenalis* fueron superiores a los obtenidos por *Cryptosporidium* spp., independientemente del origen de las aguas analizadas –residuales, potables y superficiales–.

Las concentraciones más elevadas para ambos parásitos se obtuvieron en las EDARs; así, en el afluente se identificaron ooquistes en 29 (58,0%; 1-80 OPL) depuradoras y quistes en 49 (98,0%; 2-14.400 QPL) plantas; mientras que se observaron (oo)quistes de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en los efluentes de 32 EDARs (64,0%; 1-120 OPL) y 48 EDARs (96,0%; 2-6.000 QPL), respectivamente. Estas cifras son ligeramente más elevadas que las reportadas por otros autores (Cacciò y col., 2003; Di Giovanni y col., 2006; Robertson y col., 2006b; Lim y col., 2007; Zhang y col., 2008; Cheng y col., 2009; Graczyk y col., 2009; Smith y Nichols, 2010). Los valores detectados en las aguas de entrada indican que la cryptosporidiosis y la giardiosis están ampliamente distribuidas en Galicia siendo posiblemente, esta última enfermedad más prevalente que la primera tanto en la población humana como animal. Estos datos son similares a los obtenidos en diferentes estudios epidemiológicos (Di Giovanni y col., 2006; Robertson y col., 2006b; Lim y col., 2007). Hemos comprobado que las aguas residuales domésticas brutas están generalmente diluidas con aguas de escorrentía urbana, incluso en algunos municipios (< 5.000 habitantes) estos afluentes se mezclan –directamente en la EDAR o a través de la red de alcantarillado– con aguas residuales de pequeñas industrias, hospitales comarcales, mataderos, etc., así como con las aguas procedentes de los vaciados de las fosas

sépticas que pueden contener deyecciones de origen animal. Por tanto, la introducción en la depuradora de estos vertidos que en la mayoría de los casos no han sido sometidos a un tratamiento previo, podrían justificar las altas concentraciones de ambos parásitos detectadas en los afluentes de las EDARs.

Las elevadas concentraciones de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* detectadas en los efluentes que incluso, en algunas EDARs, son mayores que las observadas en los afluentes, podrían ser consecuencia de un funcionamiento inadecuado de las depuradoras (Cacciò y col., 2003; Robertson y col., 2006b; Graczyk y col., 2007; Lim y col., 2007). Hemos comprobado que algunas EDARs tenían o habían tenido alteraciones de los procesos de tratamiento en la línea de aguas, debidas tanto a causas externas a las plantas –falta de dotación económica para costes de mantenimiento, efectos climatológicos adversos y descargas incontroladas– como a causas técnicas de las EDARs –diseño y construcción incorrectos, anomalías en la red de distribución en planta, ruptura de equipos mecánicos, fallos de los sistemas automáticos y diversas alteraciones en la línea de lodos causadas por problemas en los sistemas de digestión anaerobia o en los sistemas de estabilización de fangos–. El hallazgo de ambas formas parasitarias en estos efluentes evidencia el elevado nivel de contaminación hídrica existente que se ve reflejado por las concentraciones parasitarias detectadas en las aguas superficiales (Cacciò y col., 2003; Gómez-Couso y col., 2005, 2006a; Ruecker y col., 2007; Castro-Hermida y col., 2008a, 2009). De hecho, al considerar los afluentes de las plantas potabilizadoras, se detectaron ooquistes en 21 ETAPs (40,4%; 1-13 OPL) y se observaron quistes en 22 ETAPs (42,3%; 1-7 QPL). En las áreas recreativas analizadas, se observaron (oo)quistes de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en 16 (57,1%; 1-60 OPL) y 17 (60,7%; 1-160 QPL) muestras, respectivamente.

Estos valores, junto con los detectados en los estudios longitudinales, confirman que los efluentes de las EDARs constituyen la principal fuente de contaminación de las aguas superficiales por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en Galicia. Esta aportación de formas parasitarias a los ríos y al mar podría ser mucho más significativa que las producidas por las actividades agropecuarias y las aguas de escorrentía. Por tanto, sería necesario vigilar la presencia de estos patógenos en los efluentes de las EDARs y en las aguas superficiales, a fin de proteger la calidad de las aguas de bebida de los animales y del hombre (OMS, 2006a,b, 2009a,b; USEPA, 2007).

En los últimos años los brotes epidémicos asociados a aguas superficiales con fines recreativos afectaron a un gran número de personas. La frecuente contaminación fecal, las grandes aglomeraciones de bañistas, la resistencia al cloro así como la baja dosis infectante de ambos parásitos, hacen que las piscinas constituyan la fuente idónea para la transmisión de la

cryptosporidiosis y la giardiosis. No obstante, aunque la mayoría de brotes epidémicos por agua de recreo han estado asociados a las piscinas, también existen datos en lagos, ríos, fuentes y parques acuáticos (Anderson y col., 1998; Fayer, 2004; Craun y col., 2005; Montemayor y col., 2005; Sunderland y col., 2007; Baldursson y Karanis, 2011). A diferencia de las piscinas, las áreas recreativas naturales pueden contener 1.000 veces más carga parasitaria en el sedimento que el agua superficial (Indest, 2003; Yoder y col., 2004; Brookes y col., 2005; Pintar y col., 2010). La resuspensión del sedimento contribuirá al aumento de la concentración de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en el agua superficial (Brookes y col., 2004; Giangaspero y col., 2007).

Por otra parte, es necesario destacar que la legislación española es muy laxa en materia de control y vigilancia de la calidad de las aguas superficiales y de gestión de los vertidos al dominio público hidráulico, principalmente en lo referido a las determinaciones microbiológicas. El hecho de que no se considere la necesidad de controlar ningún organismo parásito podría comprometer la salud animal y humana, principalmente si se tiene en cuenta que la legislación se aplica en materia de control y vigilancia de la calidad de las aguas continentales –zonas de baño, piscícolas y prepotables– como aguas residuales –vertidos– (BOE, núm. 77, de 29 de marzo de 1996; BOE, núm. 157, de 2 de julio de 2002; BOE, núm. 250, de 19 de octubre de 2006). Por tanto, sería también conveniente corregir la legislación vigente para incluir el control de formas parasitarias, ya no solo de los enteropatógenos *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*, sino también de otros protozoos y helmintos que podrían estar presentes en los efluentes de las EDARs y afectar a la sanidad animal y a la salud pública; especialmente aquellos vertidos que puedan contaminar arroyos o cauces de bebida para animales, zonas de baño y áreas recreativas, zonas de cultivo de moluscos bivalvos de interés comercial o aguas superficiales destinadas a la producción de aguas potables.

La reutilización de las aguas residuales procedentes de EDARs se ha intensificado en muchos países, sobre todo para usos agrícolas, por lo que necesita cada vez más garantías de control debido al peligro que pueden tener tanto para la sanidad animal como humana (Bukhari y col., 1997; Robertson y col., 2000, 2006b; Quintero-Betancourt y col., 2003; Di Giovanni y col., 2006; Lalancette y col., 2012). Concretamente, en España cada vez es más frecuente reutilizar las aguas residuales depuradas en el sector agroalimentario –especialmente en la fertilización agrícola– o como fuente de riego en áreas recreativas –parques públicos, zonas verdes o campos de golf–. Sin embargo, los procedimientos convencionales aplicados en las EDARs no inactivan de manera suficiente los microorganismos presentes en el agua y como hemos comentado, la inactivación de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y de los quistes de *G. duodenalis* es muy baja en estas depuradoras. En este sentido, diversos países han

elaborado normativas, cada vez más exigentes, sobre las condiciones que deben cumplir los vertidos de aguas residuales depuradas al ambiente y también establecen criterios de calidad –físicos, químicos y microbiológicos– para la reutilización de estas aguas según sus usos. De hecho, se permiten reutilizar los efluentes de las EDARs siempre y cuando las aguas residuales depuradas hayan sido sometidas a un proceso de tratamiento adicional que permite adecuar su calidad al uso al que se destinan. De esta forma, los principales objetivos de los tratamientos de regeneración de las aguas son eliminar la carga contaminante residual del efluente a regenerar y desinfectarlo completamente, a fin de inactivar los microorganismos patógenos presentes antes de su utilización; de manera que la aceptabilidad de las aguas regeneradas para un uso determinado depende de la calidad física, química, microbiológica y, principalmente, del riesgo potencial para la sanidad animal y la salud pública (Asano, 1991, 1998; Cotruvo y col., 2004; USEPA, 2004; OMS, 2006a; Rose, 2007).

En España, la legislación vigente establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas (BOE, núm. 294, de 8 de diciembre de 2007) e indica los criterios de calidad obligatorios exigibles para la utilización de las aguas regeneradas según los usos (urbanos, agrícolas, industriales, recreativos y ambientales). Esta reglamentación señala que los parásitos que se deben controlar en las aguas regeneradas, independientemente de su utilización, son los nematodos intestinales de los géneros *Ancylostoma*, *Trichuris* y *Ascaris*. Además, si las aguas regeneradas se destinan a determinados usos agrícolas también se vigilará la presencia de los cestodos *Taenia solium* y *Taenia saginata*. A pesar de que estos helmintos pueden estar asociados al uso agrícola de aguas residuales sin tratar, es posible que el agua procedente de los efluentes de una estación regeneradora de agua residual (ERAR) sea una vía muy poco relevante de infección por estos parásitos. Sin embargo, no se considera la determinación de ningún protozoo parásito, situación sorprendente, si se comprueban algunos de los usos de las aguas regeneradas admitidos por la legislación; por ejemplo, riego de cultivos con sistema de aplicación del agua que permita el contacto directo de las aguas regeneradas con las partes comestibles para alimentación humana en fresco (anexo I.A, apartado 2.1a); riego de pastos para consumo de animales productores de leche o carne, e incluso el uso en acuicultura (anexo I.A, apartados 2.2b,c). De hecho, se ha observado la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y de quistes de *G. duodenalis*, en diferentes fuentes alimentarias, tanto animales como vegetales. Se han detectado formas infectantes de estos protozoos en moluscos bivalvos como ostras, almejas, mejillones y berberechos (Tamburrini y Pozio, 1999; Freire-Santos y col., 2000b, 2001; Gómez-Bautista y col., 2000; Gómez-Couso y col., 2003, 2004a; Smith y col., 2007; Giangaspero y col., 2009). En un interesante estudio, realizado por Gómez-Couso y col. (2006b), se ha comprobado que en



mejillones cocinados al vapor, los ooquistes de *C. parvum* permanecen infectantes. No obstante, todavía no se conoce ningún caso confirmado de cryptosporidiosis o de giardiosis por consumo de estos moluscos. Se han detectado también formas infectantes de ambos enteropatógenos en numerosos alimentos de origen vegetal y frutas (Monge y Chinchilla, 1996; Ortega y col., 1997; Robertson y Gjerde, 2001b; Blackburn y col., 2006; Macarasin y col., 2010).

Para controlar correctamente la calidad microbiológica de las aguas, principalmente aquellas que puedan representar un riesgo potencial para la salud animal y humana, se deberían analizar patógenos de referencia; es decir, microorganismos cuya vigilancia garantice el control de todos los agentes patógenos peligrosos. Esto conlleva la inclusión de al menos una bacteria, un virus y un protozoo patógenos (OMS, 2009b, 2011a). De hecho, la OMS indica que los tres patógenos de referencia que se podrían analizar en las aguas son *Campylobacter* spp., *Rotavirus* y *Cryptosporidium* spp. (OMS, 2009a,b, 2011a). Este criterio podría ser válido para su aplicación en España ya que el mayor número de casos declarados de gastroenteritis en nuestro país durante el año 2010, asociados a las enfermedades de transmisión alimentaria e hídrica, han sido los causados en primer lugar por *Campylobacter* spp. seguidos de *Salmonella* spp., *Rotavirus*, *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. (Centro Nacional de Epidemiología, 2011). Diversos autores proponen a *Cryptosporidium* spp. como patógeno de referencia a vigilar en las aguas –superficiales, potables, residuales y regeneradas– debido, entre otras causas, a su elevada resistencia a las condiciones ambientales y a los tratamientos habitualmente empleados en las ETAPs, EDARs y ERARs, así como por los numerosos brotes hídricos que ha causado en los últimos años (OMS, 2009a, 2011a). Por tanto, los criterios de calidad exigidos para reutilizar las aguas depuradas, según la legislación española vigente, no garantizan la ausencia de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis*, por lo que deberían incluirse ambos protozoos entre los contaminantes que pueden estar presentes en el agua regenerada.

Por otra parte, la transmisión por el agua de consumo de los enteropatógenos *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* está favorecida, principalmente, por el tamaño pequeño de los (oo)quistes y por la resistencia de las formas infectantes a los tratamientos convencionales aplicados en las ETAPs (Sterling, 1990; OMS, 2002; CDC, 2006; Castro-Hermida y col., 2008b, 2009; Reynolds y col., 2008). Los brotes epidémicos de cryptosporidiosis y de giardiosis ligados al consumo de agua de bebida, confirman la viabilidad de los (oo)quistes una vez han superado los procesos de potabilización. Desde que Shaw y col. (1977) y D'Antonio y col. (1985) documentasen los primeros brotes hídricos de *G. duodenalis* y *C. parvum* y hasta la actualidad, se describieron a nivel mundial numerosos brotes asociados al empleo de aguas de consumo y recreativas contaminadas (Karanis y col., 2002, 2007; Smith y Grimason, 2003; Robertson y col., 2006a; Clancy y Hargy, 2007; Cummins y col., 2010).

En los efluentes de las estaciones de tratamiento de agua potable, se identificaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 17 ETAPs (32,7%; 1-4 OPL) y quistes de *G. duodenalis* en 19 ETAPs (36,5%; 1-5 QPL). La presencia de estas formas infectantes en el agua apta para consumo podría indicar también posibles deficiencias en el funcionamiento de la potabilizadora.

Sin embargo y al igual que sucedió en el estudio longitudinal, en el momento de realizar la toma de muestra, el agua de bebida se distribuía con total normalidad, de tal forma que todos los efluentes de las ETAPs cumplían los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano (BOE, núm. 45, de 21 de febrero de 2003). Además, estas aguas presentaron turbideces menores de 1 UNF (datos no publicados). Por tanto y aunque el agua se considere apta para consumo, el riesgo de potenciales brotes hídricos, causados por ambos parásitos, en la población humana y animal es elevado. De hecho, en el brote ocurrido en la ciudad de Milwaukee (Estados Unidos) en 1993 donde se infectaron 403.000 personas por *Cryptosporidium* sp. los niveles de turbidez del agua estuvieron comprendidos entre 0,25-1,70 UNF (Mac Kenzie y col., 1994). En este sentido, hemos de señalar que la transmisión hídrica es el mecanismo numéricamente más importante en la epidemiología de la cryptosporidiosis y de la giardiosis. A pesar de que la OMS recomienda vigilar la presencia de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en los suministros de agua para consumo e incluso considera a *Cryptosporidium* spp. un patógeno de referencia en el agua de bebida (Ainsworth, 2004; Cotruvo y col., 2004; OMS, 2009a, 2011a); únicamente, Estados Unidos, el Reino Unido, Australia, Canadá y Nueva Zelanda han adoptado medidas para optimizar el tratamiento del agua potable y minimizar el riesgo de contaminación por estos parásitos (USEPA, 2001; DWI, 2003; ADWG, 2004; Health Canada, 2004; Ministry of Health of New Zealand, 2005). Además, estas Instituciones disponen de sistemas de información y control destinados a empresas y grupos de riesgo para el padecimiento de ambas parasitosis. Incluso, en el Reino Unido, las empresas de tratamiento de aguas destinadas al consumo humano están legalmente obligadas a monitorizar la presencia de *Cryptosporidium* spp., de forma que la detección de tan solo un ooquiste de *Cryptosporidium* spp. en un volumen de 10 litros de agua tratada e independientemente de su especie y/o viabilidad, supone un delito, a menos que la empresa implicada demuestre la aplicación de los protocolos recomendados.

Por el contrario, la Legislación Española vigente (BOE, núm. 45, de 21 de febrero de 2003) recoge en el Real Decreto 140/2003 los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano y considera agua apta para tal fin, aquella que no contenga ningún tipo de microorganismo, parásito o sustancia en una cantidad o concentración que pueda suponer un peligro para la salud humana y cumpla con los requisitos especificados en las partes A (parámetros microbiológicos), B (parámetros químicos) y D (radiactividad) del anexo I. Así, los

parámetros microbiológicos que se deben controlar en el agua de bebida son solo tres bacterias: *E. coli*, Enterococo y *Clostridium perfringens*. Además, se indica que cuando la determinación sea positiva a *C. perfringens* y exista una turbidez mayor de 5 UNFs, se determinarán, en la salida de la ETAP o depósito y si la autoridad sanitaria lo considera oportuno, *Cryptosporidium* u otros organismos o parásitos. Sin embargo, los resultados obtenidos en los trabajos que se presentan en esta Tesis Doctoral, apoyan la necesidad de incluir, sin condiciones, en esta parte del anexo I parámetros parasitarios como *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* ya que ambos enteropatógenos están presentes en las aguas de bebida, en ausencia de las bacterias anteriormente citadas y con valores inferiores a 5 UNFs; consideramos, por tanto, que esta legislación es inadecuada a las circunstancias actuales y debería ser corregida con el fin de garantizar la calidad sanitaria del agua de consumo.

Los resultados obtenidos en este último estudio muestran una amplia distribución de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en el ambiente. Se comprobó en todas las muestras analizadas e independientemente de su procedencia –EDARs, ETAPs, ARFs– un porcentaje medio de viabilidad para *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* del 90,0% y 95,0%, respectivamente; por lo que es necesaria la coordinación entre los distintos organismos responsables de la gestión de las aguas a fin de vigilar la presencia de estos patógenos en el ambiente y establecer las medidas preventivas y de control adecuadas para minimizar el riesgo de infecciones. Además, como hemos comentado, proponemos actualizar la legislación vigente en materia de control y vigilancia de la calidad de las aguas –residuales, potables y superficiales– con el fin proteger la salud animal y humana.

## CONCLUSIONES



### **Primera**

Considerando las prevalencias e intensidades de infección por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* detectadas tanto a nivel de los rebaños como individuales; la presencia de altas concentraciones de ambos enteropatógenos en las aguas superficiales; así como, el hecho de que se hayan identificado en muestras fluviales las mismas especies y genotipos detectadas en los animales, demuestra que la cryptosporidiosis y la giardiosis están ampliamente distribuidas en las ganaderías bovina y ovina de Galicia; asimismo, se confirma la contribución de los rumiantes domésticos a la contaminación de aguas superficiales, siendo esta repercusión mayor durante los meses de primavera-verano y en zonas del interior de Galicia.

### **Segunda**

Los resultados obtenidos en los estudios llevados a cabo en las ganaderías bovina y ovina, demuestran que los rumiantes domésticos mayores de un año constituyen la principal fuente de infección por *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* en los rebaños, pudiendo afectar a los animales lactantes durante la época de partos. Asimismo, se confirma que las novillas y las vacas, especialmente de aptitud lechera, son los principales reservorios zoonóticos de ambas infecciones en Galicia. Podemos concluir, además, que la contribución de los corzos y de los jabalíes a la diseminación de ambas parasitosis es poco relevante en esta región.

### **Tercera**

Las especies de *Cryptosporidium*, los genotipos de *G. duodenalis* y las elevadas concentraciones de ambos enteropatógenos detectados en los afluentes de las estaciones depuradoras de agua residual y estaciones de tratamiento de agua potable, así como en las áreas recreativas fluviales, demuestran la amplia contaminación ambiental por ambos enteropatógenos existente en Galicia y confirma que las infecciones por estos protozoos parásitos están ampliamente distribuidas en la población animal y humana, siendo la giardiosis más prevalente que la cryptosporidiosis.

### **Cuarta**

La existencia de altas concentraciones de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *G. duodenalis* potencialmente viables en las aguas tratadas en las estaciones depuradoras de agua residual, las cuales vierten directamente a los ríos y al mar, pone de manifiesto que los efluentes de estas plantas constituyen la principal fuente de contaminación de las aguas superficiales por ambos enteropatógenos en Galicia.



### **Quinta**

Siendo *C. parvum* y *G. duodenalis* genotipo A responsables de la mayoría de los casos de cryptosporidiosis y giardiosis en el hombre y en los rumiantes domésticos, su identificación en el agua apta para consumo pone de manifiesto el riesgo de potenciales brotes hídricos de ambas enfermedades en estos hospedadores.

### **Sexta**

Finalmente, la interpretación global de los resultados obtenidos pone de manifiesto la necesidad de elaborar pautas racionales de control de ambos enteropatógenos en las explotaciones ganaderas y se considera, además, la necesidad de actualizar la legislación vigente en materia de control y vigilancia de la calidad de las aguas –residuales, potables y superficiales– en orden a incluir, entre los criterios sanitarios de calidad obligatorios, a *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* para minimizar el riesgo de infección humana y animal por ambos parásitos.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abbas, F.; Morellet, N.; Hewison, A.J.M.; Merlet, J.; Cargnelutti, B.; Lourtet, B.; Angibault, J.M.; Daufresne, T.; Aulagnier, S.; Verheyden, H., 2011. Landscape fragmentation generates spatial variation of diet composition and quality in a generalist herbivore. *Oecologia*, **167**: 401-411.
- Abd El Kader, N.M.; Blanco, M.A.; Ali-Tamman, M.; Abd El Ghaffar Ael, R.; Osman, A.; El Sheik, N.; Rubio, J.M.; de Fuentes, I., 2012. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in human patients in Cairo, Egypt. *Parasitology Research*, **110**: 161-166.
- Abdul-Wahid, A.; Faubert, G.M., 2004. Similarity in cysts wall protein (CWP) trafficking between encysting *Giardia duodenalis* trophozoites and CWP-expressing human embryonic kidney-293 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **324**: 1069-1080.
- Abrahamsen, M.S.; Templeton, T.J.; Enomoto, S.; Abrahante, J.E.; Zhu, G.; Lancto, C.A.; Deng, M.; Liu, C.; Widmer, G.; Tzipori, S.; Buck, G.A.; Xu, P.; Bankier, A.T.; Dear, P.H.; Konfortov, B.A.; Spriggs, H.F.; Iyer, L.; Anantharaman, V.; Aranvid, L.; Kapur, V., 2004. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*, **304**: 441-445.
- Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**: 447-475.
- Ainsworth, R., 2004. Safe piped water: managing microbial water quality in piped distribution systems. World Health Organization (Ed.). IWA Publishing, ISBN: 1843390396, 168 pp.
- Akimbo, F.O.; Okaka, C.E.; Omoregie, R., 2010. Prevalence of intestinal parasitic infections among HIV patients in Benin City, Nigeria. *Lybian Journal of Medicine*, **5**: 5506.
- Almeida, A.A.; Delgado, M.L.; Soares, S.C.; Castro, O.A.; Moreira, M.J.; Mendonça, C.M.; Canada, N.B.; Da Costa, J.M., 2006. Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53**: S 177-178.
- Almeida, A.; Moreira, M.J.; Soares, S.; de Lurdes Delgado, M.; Figueiredo, J.; Magalhães, E.S.; Castro, A.; Viana Da Costa, A.; Correia Da Costa, J.M., 2010. Biological and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* isolates from five hydrographical basins in northern Portugal. *Korean Journal of Parasitology*, **48**: 105-111.
- Aloisio, F.; Filippini, G.; Antenucci, P.; Lepri, E.; Pezzotti, G.; Cacciò, S.M.; Pozio, E., 2006. Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. *Veterinary Parasitology*, **142**: 154-158.
- Alonso-Sanz, M.; Chaves, F.; Dronda, F.; Catalán, S.; González-López, A., 1995. Intestinal parasitoses in the prison population in the Madrid area (1991-1993). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **13**: 90-95.
- Alves, M.; Xiao, L.; Sulaiman, I.; Lal, A.A.; Matos, O.; Antunes, F., 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle and zoo ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 2744-2747.
- American Water Works Association (AWWA), 2007. Assessing and reducing risks. *Opflow*, **33**: 10-14.
- Amici, A.; Serrani, F.; Rossi, C.M.; Primi, R., 2011. Increase in crop damage caused by wild boar (*Sus scrofa* L.): the "refuge effect". *Agronomy for Sustainable Development*, doi: 10.1007/s13593-011-0057-6.
- Anderson, B.C.; Hall, R.F., 1982. Cryptosporidial infection in Idaho calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **181**: 484-485.
- Anderson, M.A.; Stewart, M.H.; Yates, M.V.; Gerba, C.P., 1998. Modeling the impact of body-contact recreation on pathogen concentrations in a source drinking water reservoir. *Water Research*, **32**: 3293-3306.

- Angus, K.W.; Appleyard, W.T.; Menzies, J.D.; Campbell, I.; Sherwood, D., 1982. An outbreak of diarrhoea associated with cryptosporidiosis in naturally reared lambs. *Veterinary Record*, **110**: 129-130.
- Appelbee, A.J.; Thompson, R.C.A.; Olson, M.E., 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife-current status and future needs. *Trends in Parasitology*, **21**: 370-376.
- Ares-Mazás, M.E.; Sela-Pérez, M.C.; Fandiño-Salorio, M.L.; Arias-Fernández, M.C., 1987. Enteroparasitismos en la población infantil gallega. *Revista Ibérica de Parasitología*, **47**: 247-252.
- Ares-Mazás, M.E.; Villacorta, I.; Bajo, T.; Pérez del Molino, M.L.; Balboa, M.J., 1988. Detección de *Cryptosporidium* spp. en las ganaderías ovina y porcina gallega. *Revista Ibérica de Parasitología*, **48**: 241-244.
- Ares-Mazás, M.E.; Villacorta, I.; Peeters, J., 1989. Acción profiláctica del ozono en el agua de bebida contaminada con ooquistes de *Cryptosporidium parvum*. VI Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología. Cáceres, España. *Libro de Resúmenes*, p. 257.
- Ares-Mazás, E.; Gómez-Couso, H.; Paniagua-Crespo, E., 2004. Feeding process of *Acanthamoeba* on *Cryptosporidium* oocysts. En: IX European Multicollloquium of Parasitology. Mas-Coma, S.; Bargues, M.D.; Esteban, J.G.; Valero, M.A. (Eds.). Valencia, España. *Libro de Resúmenes*, p. 224.
- Armson, A.; Reynoldson, J.A.; Thompson, R.C.A., 2003. A review of chemotherapeutic approaches to the treatment of *Cryptosporidium*. En: *Cryptosporidium: from molecules to disease*. Thompson, R.C.A.; Armson, A.; Ryan, U.M. (Eds.), Elsevier, pp. 395-403.
- Armson, A.; Yang, R.; Thompson, J.; Jhonson, J.; Reid, S.; Ryan, U.M., 2009. *Giardia* genotypes in pigs in Western Australia: prevalence and association with diarrhea. *Experimental Parasitology*, **121**: 381-383.
- Asano, T., 1991. Planning and implementation for water reuse projects. *Water Science and Technology*, **24**: 1-10.
- Asano, T., 1998. Wastewater reclamation and reuse. Asano, T. (Ed.), CRC Press, ISBN: 1-566676-620-6, 1528 pp.
- Aspöck, H.; Hassl, A., 1990. Parasitic infections in HIV patients in Austria: first results of a long-term study. *International Journal of Medical Microbiology*, **272**: 540-546.
- Assavasilavasukul, P.; Lau, B.L.T.; Harrington, G.W.; Hoffman, R.M.; Borchardt, M.A., 2008. Effect of pathogen concentrations on removal of *Cryptosporidium* and *Giardia* by conventional drinking water treatment. *Water Research*, **42**: 2678-2690.
- Atwill, E.R.; Sweitzer, R.A.; Pereira, M.G.C.; Gardner, I.A.; Van Vuren, D.; Boyce, W.M., 1997. Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 3946-3949.
- Atwill, E.R.; Johnson, E.M.; Pereira-María-das-Graças, C., 1999. Association of herd composition, stocking rate and duration of calving season with fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in beef herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **215**: 1833-1838.
- Augustin-Bichl, G.; Boch, J.; Henkel, G., 1984. Kryptosporidien-Infektionen bei Hund and Katze. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, **97**: 179-181.
- Australian Drinking Water Guidelines (ADWG), 2004. National water quality management strategy. <http://www.nhmrc.gov.au>.

- Awad-El-Kariem, F.M.; Robinson, H.A.; Petry, F.; McDonald, V.; Evans, D.; Casemore, D., 1998. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using molecular and biological markers. *Parasitology Research*, **84**: 297-301.
- Aydin, A.F.; Besirbellioglu, B.A.; Avci, I.Y.; Tanyuksel, M.; Araz, E.; Pahsa, A., 2004. Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **50**: 147-151.
- Babatunde, S.K.; Salami, A.K.; Fabiyi, J.P.; Agbede, O.O.; Desalu, O.O., 2010. Prevalence of intestinal parasitic infestation in HIV seropositive and seronegative patients in Ilorin, Nigeria. *Annals of African Medicine*, **9**: 123-128.
- Bajer, A., 2008. *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. infections in humans, animals and the environment in Poland. *Parasitology Research*, **104**: 1-17.
- Bajer, A.; Bednarska, M.; Paziewska, A.; Romanowski, J.; Siński, E., 2008. Semi-aquatic animals as a source of water contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Wiadomości Parazytologiczne*, **54**: 315-318.
- Bajer, A.; Toczyłowska, B.; Bednarska, M.; Siński, E., 2012. Effectiveness of water treatment for the removal of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. *Epidemiology and Infection*, **4**: 1-9.
- Baldursson, S.; Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks- an update 2004-2010. *Water Research*, **45**: 6603-6614.
- Barker, I.K.; Carbonell, P.L., 1974. *Cryptosporidium agni* sp. n. from lambs and *Cryptosporidium bovis* sp. n. from a calf with observations on the oocysts. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **44**: 289-298.
- Barreto, M.L.; Genser, B.; Strina, A.; Teixeira, M.G.; Assis, A.M.; Rego, R.F.; Teles, C.A.; Prado, M.S.; Matos, S.; Alcántara-Neves, N.M.; Cairncross, S., 2010. Impact of a citywide sanitation program in Northeast Brazil on intestinal parasites infection in young children. *Environmental Health Perspectives*, **118**: 1637-1642.
- Barta, J.R.; Thompson, R.C.A., 2006. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in Parasitology*, **22**: 463-468.
- Barwick, R.S.; Mohammed, H.O.; White, M.E.; Bryant, R.B., 2003. Prevalence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. on dairy farms in southeastern New York state. *Preventive Veterinary Medicine*, **59**: 1-11.
- Baskin, G.B., 1996. Cryptosporidiosis of the conjunctiva in SIV-infected rhesus monkeys. *Journal of Parasitology*, **82**: 630-632.
- Beach, M.J.; McNeil, M.; Arrowood, M.; Kreckman, L.; Craig, A.; Donaldson, K.; Sinor, M.; Zambie, J.; Kauffman, B.; Berry, J.; Campbell, T.; Galvin, V.; Stetler, H.; Juranek, D.; Addis, D., 1996. *Cryptosporidium* in a waterpark: largest U.S. recreational waterborne outbreak. *Proceedings of the 45<sup>th</sup> Annual Epidemic Intelligence Service (EIS) Conference*. Atlanta, Estados Unidos.
- Beck, R.; Sprong, H.; Lucinger, S.; Pozio, E.; Cacciò, S.M., 2011. A large survey of Croatian wild mammals for *Giardia duodenalis* reveals a low prevalence and limited zoonotic potential. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **11**: 1049-1055.
- Berg, I.E.; Peterson, A.C.; Freeman, T.P., 1978. Ovine cryptosporidiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **173**: 1586-1587.

- Berrilli, F.; Di Cave, D.; D'Orazi, C.; Orecchia, P.; Xhelilaj, L.; Bejko, D.; Çaça, P.; Bebeci, D.; Cenko, F.; Donia, D.; Divizia, M., 2006. Prevalence and genotyping of human isolates of *Giardia duodenalis* from Albania. *Parasitology International*, **55**: 295-297.
- Betancourt, W.Q.; Rose, J.B., 2004. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Veterinary Parasitology*, **126**: 219-234.
- Blackburn, B.G.; Mazurek, J.M.; Hlavsa, M.; Park, J.; Tillapaw, M.; Parrish, M.; Salehi, E.; Franks, W.; Koch, E.; Smith, F.; Xiao, L.; Arrowood, M.; Hill, V.; Da Silva, A.; Johnston, S.; Jones, J.L., 2006. Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider. *Emerging Infectious Diseases*, **12**: 684-686.
- Blanchard, R., 1888. Remarques sur le megastome intestinal. *Bulletin de la Société Zooligique de France*, **3**: 18.
- Bodley-Tickell, A.T.; Kitchen, S.E.; Sturdee, A.P., 2002. Ocurrance of *Cryptosporidium* in agricultural surface water an annual farming cycle in lowland UK. *Water Research*, **36**: 1880-1886.
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (núm. 312) de 30 de diciembre de 1995. Real Decreto 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas.
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (núm. 61) de 11 de marzo de 1996. Real Decreto 261/1996, de 16 de febrero, sobre protección de las aguas contra la contaminación producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias.
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (núm. 77) de 29 de marzo de 1996. Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas.
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (núm. 157) de 2 de julio de 2002. Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación.
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (núm. 45) de 21 de febrero de 2003. Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (núm. 250) de 19 de octubre de 2006. ORDEN MAM/3207/2006, de 25 de septiembre, por la que se aprueba la instrucción técnica complementaria MMA-EECC-1/06, determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (núm. 260) de 30 de octubre de 2007. Real Decreto 1393/2007, de 29 de octubre, por el que se establece la ordenación de las enseñanzas universitarias oficiales.
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (núm. 294) de 8 de diciembre de 2007. Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas.
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (núm. 172) de 17 de julio de 2009. Orden SAS/1915/2009, de 8 de julio, sobre sustancias para el tratamiento del agua destinada a la producción de agua de consumo humano.
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (núm. 35) de 10 de febrero de 2011. Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado.
- Boletín Oficial de la Junta de Andalucía (BOJA) (núm. 4) de 8 de enero de 2009. Orden de 11 de diciembre de 2008, por la que se modifica la Orden de 19 de diciembre de 1996, por la que se desarrolla el Sistema de Vigilancia Epidemiológica en la Comunidad Autónoma de Andalucía y se establece la relación de enfermedades de declaración obligatoria.



- Boulter-Bitzer, J.I.; Lee, H.; Trevors, J.T., 2007. Molecular targets for detection and immunotherapy in *Cryptosporidium parvum*. *Biotechnology Advances*, **25**: 13-44.
- Bouwer, H.; Idelovith, E., 1987. Quality requirements for irrigation with sewage water. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering*, **113**: 516-535.
- Bowman, D.D., 2008. Waste management. *En: Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Fayer, R.; Xiao, L. (Eds.), CRC Press, pp. 371-385.
- Brandonisio, O.; Maggi, P.; Panaro, M.A.; Lisi, S.; Andriola, A.; Acquafredda, A.; Angarano, G., 1999. Intestinal protozoa in HIV-infected patients in Apulia, South Italy. *Epidemiology and Infection*, **3**: 457-462.
- Briancesco, R.; Bonadonna, L., 2005. An Italian study on *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater, fresh water and treated water. *Environmental Monitoring and Assessment*, **104**: 445-457.
- Brook, E.; Hart, C.A.; French, N.; Christley, R., 2008. Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. *Veterinary Parasitology*, **152**: 46-52.
- Brook, E.J.; Anthony Hart, C.; French, N.P.; Christley, R.M., 2009. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *Veterinary Journal*, **179**: 378-382.
- Brookes, J.D.; Antenucci, J.; Hipsey, M.; Burch, M.D.; Ashbolt, N.J.; Ferguson, C., 2004. Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs. *Environment International*, **30**: 741-759.
- Brookes, J.D.; Hipsey, M.; Burch, M.D.; Regel, R.H.; Linden, L.G.; Ferguson, C., 2005. Relative value of surrogate indicators for detecting pathogens in lakes and reservoirs. *Environmental Science and Technology*, **39**: 8614-8621.
- Budu-Amoako, E.; Greenwood, S.J.; Dixon, B.R.; Barkema, H.W.; McClure, J.T., 2012. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* on beef farms and water sources within the vicinity of the farms on Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*, **184**: 1-9.
- Bukhari, Z.; Smith, H.V.; Sykes, N.; Humphreys, S.W.; Paton, C.A.; Girdwood, R.W.A.; Fricker, C.R., 1997. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England. *Water Science and Technology*, **35**: 385-390.
- Buret, A.; den Hollander, N.; Wallis, P.M.; Befus, D.; Olson, M.E., 1990. Zoonotic potential in giardiasis in domestic ruminants. *Journal of Infectious Diseases*, **162**: 231-237.
- Butkus, M.A.; Bays, J.T.; Labare, M.P., 2003. Influence of surface characteristics on the stability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 3819-3835.
- Cacciò, S.M., 2004. New methods for the diagnosis of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Parassitologia*, **46**: 151-155.
- Cacciò, S.M., 2005. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia*, **47**: 185-192.
- Cacciò, S.M.; Sprong, H., 2011. Epidemiology of giardiasis in humans. *En: Giardia a model organism*. Luján, H.D.; Svärd, S. (Eds.), SpringerWienNewYork, pp. 17-28.
- Cacciò, S.M.; De Giacomo, M.; Aulicino, F.A.; Pozio, E., 2003. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 3393-3398.
- Cacciò, S.M.; Thompson, R.C.A.; McLauchlin, J.; Smith, H.V., 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, **21**: 430-437.

- Cacciò, S.M.; Beck, R.; Lalle, M.; Marinculic, A.; Pozio, E., 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *International Journal for Parasitology*, **38**: 1523-1531.
- Cama, V.A.; Bern, C.; Sulaiman, I.M.; Gilman, R.H.; Ticona, E.; Vivar, A.; Kawai, V.; Vargas, D.; Zhou, L.; Xiao, L., 2003. *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50**: S 531-533.
- Cama, V.A.; Arrowood, M.J.; Ortega, Y.R.; Xiao, L., 2006. Molecular characterization of the *Cryptosporidium parvum* IOWA isolate kept in different laboratories. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53**: S 40-42.
- Cama, V.A.; Ross, J.M.; Crawford, S.; Kawai, V.; Chavez-Valdez, R.; Vargas, D.; Vivar, A.; Ticona, E.; Navincopa, M.; Williamson, J.; Ortega, Y.; Gilman, R.H.; Bern, C.; Xiao, L., 2007. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *Journal of Infectious Diseases*, **196**: 684-691.
- Cama, V.A.; Bern, C.; Roberts, J.; Cabrera, L.; Sterling, C.R.; Ortega, Y.; Gilman, R.H.; Xiao, L., 2008. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerging Infectious Diseases*, **14**: 1567-1574.
- Campbell, A.T.; Wallis, P., 2002. The effect of UV irradiation on human-derived *Giardia lamblia* cysts. *Water Research*, **36**: 963-969.
- Campbell, A.T.; Robertson, L.J.; Smith, H.V., 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of *in vitro* excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 3488-3493.
- Campos-Reales-Pineda, A.E.; Orta de Velasquez, M.T.; Rojas-Valencia, M.N., 2008. The use of ozone during advanced primary treatment of wastewater for its reuse in agriculture: an approach to enhance coagulation, disinfection and crop productivities. *Water Science and Technology*, **57**: 955-962.
- Cardona, G.A.; Carabin, H.; Goñi, P.; Arriola, L.; Robinson, G.; Fernández-Crespo, J.C.; Clavel, A.; Chalmers, R.M.; Carmena, D., 2011. Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Álava, North of Spain. *Science of the Total Environment*, **412-413**: 101-108.
- Carmena, D.; Aguinagalde, X.; Zigorraga, C.; Fernández-Crespo, J.C.; Ocio, J.A., 2007. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water in northern Spain. *Journal of Applied Microbiology*, **102**: 619-629.
- Cartwright, R.Y.; Colbourne, J.S., 2002. Cryptosporidiosis and hotel swimming pools - a multifaceted challenge. *Water Science and Technology*, **2**: 47-54.
- Carvalho-Costa, F.A.; Gonçalves, A.Q.; Lassance, S.L.; de Albuquerque, C.P.; Leite, J.P.; Bóia, M.N., 2007. Detection of *Cryptosporidium* spp. and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **40**: 346-348.
- Casson, L.W.; Sorber, C.A.; Sykora, J.L.; Gavaghan, P.D.; Shapiro, M.A.; Jakubowski, W., 1990. *Giardia* in wastewater—effect of treatment. *Water Pollution Control Federation Research Journal*, **62**: 670-675.
- Castañó-Pascual, A.; Astasio-Arbiza, P.; Vos-Arenillas, A.; Domínguez-Carmona, M., 1988. Parasitismos intestinales en niños de una población madrileña. *Revista Ibérica de Parasitología*, **48**: 255-256.

- Castro-Hermida, J.A.; González-Losada, Y.; Freire-Santos, F.; Mezo-Menéndez, M.; Ares-Mazás, E., 2001a. Evaluation of beta-cyclodextrin against natural infections of cryptosporidiosis in calves. *Veterinary Parasitology*, **101**: 85-89.
- Castro-Hermida, J.A.; Quílez-Cinca, J.; López-Bernard, F.; Sánchez-Acedo, C.; Freire-Santos, F.; Ares-Mazás, E., 2001b. Treatment with beta-cyclodextrin of natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs under field conditions. *International Journal for Parasitology*, **31**: 1134-1137.
- Castro-Hermida, J.A.; González-Losada, Y.A.; Ares-Mazás, E., 2002a. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, **106**: 1-10.
- Castro-Hermida, J.A.; González-Losada, Y.A.; Mezo-Menéndez, M.; Ares-Mazás, E., 2002b. A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Veterinary Parasitology*, **106**: 11-17.
- Castro-Hermida, J.A.; Pors, I.; Otero-Espinar, F.; Luzardo-Álvarez, A.; Ares-Mazás, E.; Chartier, C., 2004. Efficacy of alpha-cyclodextrin against experimental cryptosporidiosis in neonatal goats. *Veterinary Parasitology*, **120**: 35-41.
- Castro-Hermida, J.A.; Delafosse, A.; Pors, I.; Ares-Mazás, E.; Chartier, C., 2005. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. *Veterinary Record*, **157**: 623-627.
- Castro-Hermida, J.A.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia Da Costa, J.M.; Mezo, M., 2006a. Prevalence and preliminary genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from asymptomatic heifers in Galicia (NW, Spain). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53**: S 22-23.
- Castro-Hermida, J.A.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia Da Costa, J.M.; Mezo, M., 2006b. Prevalence and preliminary genetic analysis of *Giardia* isolated from adult sheep in Galicia (NW, Spain). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53**: S 172-173.
- Castro-Hermida, J.A.; Carro-Corral, C.; González-Warleta, M.; Mezo, M., 2006c. Prevalence and intensity of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, **53**: 244-246.
- Castro-Hermida, J.A.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia Da Costa, J.M.; Rumbo-Lorenzo, C.; Mezo, M., 2007a. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitology Research*, **101**: 1443-1448.
- Castro-Hermida, J.A.; González-Warleta, M.; Mezo, M., 2007b. Natural infection by *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in sheep and goats in Galicia (NW Spain). *Small Ruminant Research*, **72**: 96-100.
- Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia Da Costa, J.M.; Mezo, M., 2008a. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Water Research*, **42**: 3528-3538.
- Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia Da Costa, J.M.; Mezo, M., 2008b. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water. *Science of the Total Environment*, **405**: 45-53.
- Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia Da Costa, J.M.; Mezo, M., 2009. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals. *Water Research*, **43**: 4133-4142.

- Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; González-Warleta, M.; Mezo, M., 2010. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. *Water Research*, **44**: 5887-5896.
- Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia Da Costa, J.M.; Mezo, M., 2011a. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain). *Science of the Total Environment*, **409**: 2451-2459.
- Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; González-Warleta, M.; Mezo, M., 2011b. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Galicia (NW, Spain). *Veterinary Parasitology*, **179**: 216-219.
- Causapé, A.C.; Sánchez-Acedo, C.; Quílez, J.; del Cacho, E.; Viu, M., 1999. Efficacy of halofuginone lactate against natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs. *Research and Reviews in Parasitology*, **59**: 41-46.
- Causapé, A.C.; Quílez, J.; Sánchez-Acedo, C.; del Cacho, E.; López-Bernad, F., 2002. Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infections in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, **104**: 287-298.
- Cavalier-Smith, T., 2003. Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European Journal of Protistology*, **39**: 338-348.
- Cegielski, J.P.; Ortega, Y.R.; McKee, S.; Madden, J.F.; Gaido, L.; Schwartz, D.A.; Manji, K.; Jorgensen, A.F.; Miller, S.E.; Pulipaka, U.P.; Msengi, A.E.; Mwakyussa, D.H.; Sterling, C.R.; Reller, R.B., 1999. *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon* and *Cyclospora* infections in pediatric and adult patients with diarrhea in Tanzania. *Clinical Infectious Diseases*, **28**: 314-321.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2006. Fact sheet crypto-protection against recreational water illness. <http://www.cdc.gov/healthyswimming/cryptofacts.htm>.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2008. Communitywide cryptosporidiosis outbreak-Utah, 2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summary*, **57**: 989-993.
- Centro Nacional de Epidemiología, 2003. Vigilancia epidemiológica de la cryptosporidiosis en España. *Boletín Epidemiológico Semanal*, **11**: 277-284.
- Centro Nacional de Epidemiología, 2008. Cambios en el Sistema de Información Microbiológica en el año 2009. *Boletín Epidemiológico Semanal*, **16**: 261.
- Centro Nacional de Epidemiología, 2009. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2009. <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnico/fd-vigilancias-alertas/enfermedades.shtml>.
- Centro Nacional de Epidemiología, 2011. Comentario epidemiológico de las Enfermedades de Declaración Obligatoria y Sistema de Información Microbiológica. España. Año 2010. *Boletín Epidemiológico Semanal*, **19**: 100-111.
- Chacka, W.; Scharringa, J.; Verheul, A.F.M.; Verhoef, J.; Van Strijp, A.G.; Hoepelman, I.M., 1995. Quantitative analysis of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by human peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **2**: 753-759.
- Chalmers, R.M.; Elwin, K.; Reilly, W.J.; Irvine, H.; Thomas, A.L.; Hunter, P.R., 2002. *Cryptosporidium* in farmed animals: the detection of a novel isolate in sheep. *International Journal for Parasitology*, **32**: 21-26.

- Chalmers, R.M.; Ferguson, C.; Cacciò, S.; Gasser, R.B.; Abs EL-Osta, Y.G.; Heijnen, L.; Xiao, L.; Elwin, K.; Hadfield, S.; Sinclair, M.; Stevens, M., 2005. Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *International Journal for Parasitology*, **35**: 397-410.
- Chalmers, R.M.; Elwin, K.; Thomas, A.L.; Guy, E.C.; Mason, B., 2009. Long-term *Cryptosporidium* typing reveals the aetiology and species-specific epidemiology of human cryptosporidiosis in England and Wales, 2000 to 2003. *Euro Surveillance*, **14**.
- Chalmers, R.M.; Smith, R.; Elwin, K.; Clifton-Hadley, F.A.; Giles, M., 2011. Epidemiology of anthroponotic and zoonotic human cryptosporidiosis in England and Wales, 2004-2006. *Epidemiology and Infection*, **139**: 700-712.
- Chappell, C.L.; Okhuysen, P.C.; White, A.C. Jr., 2003. *Cryptosporidium parvum*: infectivity, pathogenesis and the host-parasite relationship. En: *Cryptosporidium* from molecules to disease. Thompson, R.C.A.; Armson, A.; Ryan, U.M. (Eds.), Elsevier BV, pp. 19-50.
- Chappell, C.L.; Okhuysen, P.C.; Langer-Curry, R.; Widmer, G.; Akiyoshi, D.E.; Tanriverdi, S., 2006. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **75**: 851-857.
- Chartier, C.; Mallereau, M.P.; Naciri, M., 1996. Prophylaxis using paromomycin of natural cryptosporidial infection in neonatal kids. *Preventive Veterinary Medicine*, **25**: 357-361.
- Chauret, C.; Springthorpe, S.; Saltar, S., 1999. Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. *Canadian Journal of Microbiology*, **45**: 257-262.
- Chaves, M.P.; Fernández, J.A.; Ospina, I.; López, M.C.; Moncada, L.; Reyes, P., 2007. *Giardia duodenalis* prevalence and associated risk factors in preschool and school-age children of rural Colombia. *Biomedica*, **27**: 345-351.
- Chen, F.; Huang, K., 2012. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle from farms in China. *Journal of Veterinary Science*, **13**: 15-22.
- Cheng, H.W.; Lucy, F.E.; Graczyk, T.K.; Broaders, M.A.; Tamang, L.; Connolly, M., 2009. Fate of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts during secondary wastewater treatments. *Parasitology Research*, **105**: 689-696.
- Cheng, H.W.; Broaders, M.A.; Lucy, F.E.; Mastitsky, S.E.; Graczyk, T.K., 2012. Determining potential indicators of *Cryptosporidium* oocysts through the wastewater treatment process. *Water Science and Technology*, **65**: 875-882.
- Cimon, K.Y.; Oberst, R.D.; Upton, S.J.; Mosier, D.A., 1996. Biliary cryptosporidiosis in two corn snakes (*Elaphe guttata*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **8**: 398-399.
- Clancy, J.L.; Hargy, T.M., 2007. Waterborne: drinking water. En: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer, R.; Xiao, L. (Eds.), CRC Press, pp. 305-333.
- Clancy, J.L.; Gollnitz, W.D.; Tabib, Z., 1994. Commercial labs, how accurate are they?. *Journal of American Water Works Association*, **86**: 89-97.
- Clancy, J.L.; Hargy, T.M.; Battigelli, D.A.; Marshall, M.M.; Korich, D.; Nicholson, W.L., 2002. Susceptibility of multiple strains of *Cryptosporidium parvum* to UV light. *Final Report of American Waters Works Association Research Foundation*, Denver, Colorado.

- Clavel, A.; Olivares J.L.; Fleta, J.; Castillo, J.; Varea, M.; Ramos, F.J.; Arnal, A.C.; Quílez, J., 1996. Seasonality of cryptosporidiosis in children. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **15**: 77-79.
- Clavel-Parrilla, A.; Castillo-García, F.J.; Alvira-Calabaza, A., 1987. Cryptosporidiosis en pacientes asistidos en un hospital general. V Congreso Nacional de Parasitología. Salamanca, España. *Libro de Resúmenes*, pp. 291-292.
- Coklin, T.; Farber, J.; Parrington, L.; Dixon, B., 2007. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Veterinary Parasitology*, **150**: 297-305.
- Coklin, T.; Uehlinger, F.D.; Farber, J.M.; Barkema, H.W.; O'Handley, R.M.; Dixon, B.R., 2009. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. on dairy calves from 11 farms in Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*, **160**: 323-326.
- Coklin, T.; Farber, J.M.; Parrington, L.J.; Coklin, Z.; Ross, W.H.; Dixon, B.R., 2010. Temporal changes in the prevalence and shedding patterns of *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy calves at an agricultural college in Ontario, Canada. *Canadian Veterinary Journal*, **51**: 841-846.
- Connelly, S.J.; Wolyniak, E.A.; Dieter, K.L.; Williamson, C.E.; Jellison, K.L., 2007. Impact of zooplankton grazing on the excystation, viability and infectivity of the protozoan pathogens *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 7277-7282.
- Coombs, G.H., 1999. Biochemical peculiarities and drug targets in *Cryptosporidium parvum*: lessons from other coccidian parasites. *Parasitology Today*, **15**: 333-338.
- Coombs, G.H.; Denton, H.; Brown, S.M.A.; Thong, K.W., 1997. Biochemistry of the coccidian. *Advances in Parasitology*, **39**: 141-226.
- Cordova, O.; Vargas, F.; González, A.; Pérez-Cordón, G.; Velasco, J.R.; Sánchez-Moreno, M.; Rodríguez-González, I.; Rosales, M.J., 2006. Intestinal parasitism in Peruvian children and molecular characterization of *Cryptosporidium* species. *Parasitology Research*, **98**: 576-581.
- Corona-Vasquez, B.; Samuelson, A.; Rennecker, J.L.; Marinas, B.J., 2002. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine. *Water Research*, **36**: 4053-4063.
- Cotruvo, J.A.; Dufour, A.; Rees, G.; Bartram, J.; Carr, R.; Cliver, D.O.; Craun, G.F.; Fayer, R.; Gannon, V.P.J., 2004. Waterborne zoonoses: identification, causes and control. Cotruvo, J.A.; Dufour, A.; Rees, G.; Bartram, J.; Carr, R.; Cliver, D.O.; Craun, G.F.; Fayer, R.; Gannon, V.P.J. (Eds.), IWA Publishing, ISBN: 1843390582, 506 pp.
- Cotte, L.; Rabodonirina, M.; Piens, M.A.; Perreard, M.; Mojon, M.; Trepo, C., 1993. Prevalence of intestinal protozoans in French patients infected with HIV. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, **6**: 1024-1029.
- Cox, F.E.G., 2002. Systematics of the parasitic Protozoa. *Trends in Parasitology*, **18**: 108.
- Craik, S.A.; Finch, G.R.; Bolton, J.R.; Belosevic, M., 2000. Inactivation of *Giardia muris* cysts using medium-pressure ultraviolet radiation in filtered drinking water. *Water Research*, **34**: 4325-4332.
- Craun, G.F.; Calderon, R.L.; Craun, M.F., 2005. Outbreaks associated with recreational water in United States. *International Journal of Environmental Health Research*, **15**: 243-262.



- Crotti, D.; D'Annibale, M.L.; Fonzo, G.; Lalle, M.; Cacciò, S.M.; Pozio, E., 2005. *Dientamoeba fragilis* is more prevalent than *Giardia duodenalis* in children and adults attending a day care centre in Central Italy. *Parasite*, **12**: 165-170.
- Cummins, E.; Kennedy, R.; Cormican, M., 2010. Quantitative risk assessment of *Cryptosporidium* in tap water in Ireland. *Science of the Total Environment*, **408**: 740-753.
- Current, W.L., 1985. Cryptosporidiosis. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, **187**: 1334-1338.
- Current, W.L.; Haynes, T.B., 1984. Complete development of *Cryptosporidium* in cell cultures. *Science*, **224**: 603-605.
- Current, W.L.; García, L.S., 1991. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **4**: 325-358.
- Curriero, F.C.; Patz, J.A.; Rose, J.B.; Subhash, L., 2001. The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994. *American Journal of Public Health*, **91**: 1194-1199.
- D'Antonio, R.G.; Winn, R.E.; Taylor, J.P.; Gustafson, T.L.; Current, W.L.; Rhodes, M.M.; Gary, G.W.; Zajac, R.A., 1985. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Annals of Internal Medicine*, **103**: 886-888.
- Dai, X.; Boll, J., 2006. Settling velocity of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. *Water Research*, **40**: 1321-1325.
- Daryani, A.; Sharif, M.; Meigouni, M.; Mahmoudi, F.B.; Rafiei, A.; Gholami, Sh.; Khalilian, A.; Gohardehi, Sh.; Mirabi, A.M., 2009. Prevalence of intestinal parasites and profile of CD4+ counts in HIV+/AIDS people in north of Iran, 2007-2008. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **12**: 1277-1281.
- Davies, A.P.; Chalmers, R.M., 2009. Cryptosporidiosis. *British Medical Journal*, **339**: b4168.
- Davies, A.P.; Campbell, B.; Evans, M.R.; Bone, A.; Roche, A.; Chalmers, R.M., 2009. Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom. *Pediatric Infectious Disease Journal*, **28**: 838-840.
- Dávila, C.; del Castillo, A.; Valladares, B.; de Armas, F.; Jiménez, J.F., 1993. Aportación al conocimiento de *Cryptosporidium* sp. en la isla de Tenerife. III Congreso Ibérico de Parasitología. Lisboa, Portugal, *Acta Parasitologica Portuguesa*, **1**: 181.
- de Graaf, D.C.; Vanopdenbosch, E.; Ortega-Mora, L.M.; Abbassi, H.; Peeters, J.E., 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology*, **19**: 1269-1287.
- de la Fuente, R.; García, A.; Ruíz-Santa-Quiteria, J.A.; Luzón, M.; Cid, D.; García, S.; Orden, J.A.; Gómez-Bautista, M., 1998. Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, **36**: 145-152.
- de la Fuente, R.; Luzón, M.; Ruíz-Santa-Quiteria, J.A.; García, A.; Cid, D.; Orden, J.A.; García, S.; Sanz, R.; Gómez-Bautista, M., 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30 –day– old diarrheic dairy calves in central Spain. *Veterinary Parasitology*, **80**: 179-185.
- de las Heras, M.; García de Jalón, J.A.; Balaguer, L.; Badiola, J.J., 1987. Diarreas en corderos y cabritos asociadas a cryptosporidios. *Medicina Veterinaria*, **4**: 273-276.



- de Souza, L.R.; Rodrigues, M.A.M.; Morceli, J.; Kemp, R.; Mendes, R.P., 2004. Cryptosporidiosis of the biliary tract mimicking pancreatic cancer in an AIDS patient. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **37**: 182-185.
- De Zuane, J., 1997. Handbook of drinking water quality. Jhon Wiley and Sons (Eds.), ISBN: 0-471-28789-X, 592 pp.
- del Águila, C.; Navajas, R.; Gurbindo, D.; Ramos, J.T.; Mellado, M.J.; Fenoy, S.; Muñoz-Fernández, M.A.; Subirats, M.; Ruíz, J.; Pieniazek, N.J., 1997. Microsporidiosis in HIV-positive children in Madrid (Spain). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **44**: S 84-85.
- Delahay, R.J.; Smith, G.C.; Barlow, A.M.; Walker, N.; Harris, A.; Clifton-Hadley, R.S.; Cheeseman, C.L., 2007. Bovine tuberculosis infection in wild mammals in the South-West region of England: a survey of prevalence and a semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. *Veterinary Journal*, **173**: 287-301.
- Deng, M.Y.; Cliver, D.O., 1992. Degradation of *Giardia lamblia* cysts in mixed human and swine wastes. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 2368-2374.
- Deng, M.Q.; Cliver, D.O., 1999. Improved immunofluorescence assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* from asymptomatic adult cervine animals. *Parasitology Research*, **85**: 733-736.
- Denton, H.; Brown, S.M.A.; Roberts, C.W.; Alexander, J.; McDonald, V.; Thong, K.W.; Coombs, G.H., 1996. Comparison of the phosphofructokinase and pyruvatekinase activities of *Cryptosporidium parvum*, *Eimeria tenella* and *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **76**: 23-29.
- deRegnier, D.P.; Cole, L.; Schupp, D.G.; Erlandsen, S.L., 1989. Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river and tap water. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**: 1223-1229.
- Di Giovanni, G.D.; Betancourt, W.Q.; Hernández, J.; Assadian, N.W.; Flores-Marguez, J.P.; Jaramillo-López, E., 2006. Investigation of potential zoonotic transmission of cryptosporidiosis and giardiasis through agricultural use of reclaimed wastewater. *International Journal of Environmental Health Research*, **16**: 405-418.
- Diario Oficial de Galicia (DOG) (núm. 129) de 3 de julio de 1990. Decreto 350/1990, de 22 de junio, sobre fluoración de las aguas potables de consumo público.
- Diario Oficial de Galicia (DOG) (núm. 181) de 17 de Septiembre de 1999. Orde do 7 de setembro de 1999 pola que se aproba o Código de Boas Prácticas Agrarias.
- Díaz, V.; Verdejo, M.J.; Campos, M.; Mañas, I.; Lozano, J.; Peis, J., 1988. Prevalencia de algunas protozoosis intestinales humanas en la provincia de Granada. *Revista Ibérica de Parasitología*, **48**: 119-125.
- Díaz, V.; Campos, M.; Lozano, J.; Mañas, I.; González, J., 1996. Aspects on animal giardiasis in Granada province (southern Spain). *Veterinary Parasitology*, **64**: 171-176.
- Díaz, P.; Quílez, J.; Chalmers, R.M.; Panadero, R.; López, C.; Sánchez-Acedo, C.; Morondo, P.; Díez-Baños, P., 2010a. Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). *Parasitology*, **137**: 1187-1193.
- Díaz, P.; Quílez, J.; Robinson, G.; Chalmers, R.M.; Díez-Baños, P.; Morondo, P., 2010b. Identification of *Cryptosporidium xiaoi* in diarrhoeic goat kids (*Capra hircus*) in Spain. *Veterinary Parasitology*, **172**: 132-134.
- Dillingham, R.A.; Lima, A.A.; Guerrant, R.L., 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, **4**: 1059-1066.

- Directiva Europea 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991. Directiva relativa al tratamiento de las aguas residuales urbanas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L*, **135**: 40-52.
- Directiva Europea 91/676/CEE del Consejo, de 12 de diciembre de 1991. Directiva relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos utilizados en la agricultura. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L*, **375**: 1-8.
- Directiva Europea 91/676/CEE del Consejo, de 12 de diciembre de 1991. Corrección de errores. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L*, **92**: 51.
- Dixon, B.; Parrington, L.; Cook, A.; Pintar, K.; Pollari, F.; Kelton, D.; Farber, J., 2011. The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from beef and dairy cattle in Ontario, Canada. *Veterinary Parasitology*, **175**: 20-26.
- Drinking Water Inspectorate (DWI), 2003. Drinking water for England and Wales –annual report 2003. <http://www.dwi.gov.uk/annrep03/mainindex.shtm>.
- Drinking Water Inspectorate (DWI), 2010. Annual reports. <http://dwi.defra.gov.uk>.
- Dubey, J.P., 1993. Intestinal protozoa infections. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **23**: 37-55.
- Dubey, J.P.; Speer, C.A.; Fayer, R., 1990. General biology of *Cryptosporidium*. En: *Cryptosporidiosis of man and animals*. Dubey, J.P.; Speer, C.A.; Fayer, R. (Eds.), CRC Press, pp. 1-29.
- Dunlap, B.G.; Thies, M.L., 2002. *Giardia* in beaver (*Castor canadensis*) and nutria (*Myocastor coypus*) from east Texas. *Journal of Parasitology*, **88**: 1254-1258.
- DuPont, H.L.; Chappell, C.L.; Sterling, C.R.; Okhuysen, P.C.; Rose, J.B.; Jakubowski, W., 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New England Journal of Medicine*, **332**: 855-859.
- Edling, T.D.; Hang, T.L.; Chakraborty, P.R., 1990. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* in vitro. *Journal of Infectious Diseases*, **162**: 1408-1411.
- Eisenberg, J.N.; Seto, E.Y.; Colford, J.M. Jr.; Olivieri, A.; Spear, R.C., 1998. An analysis of the Milwaukee cryptosporidiosis outbreak based on a dynamic model of the infection process. *Epidemiology*, **9**: 255-263.
- El Guamri, Y.; Belfhyti, D.; Achicha, A.; Tiabi, M.; Aujjar, N.; Barkia, A.; El Kharrim, K.; Barkia, H.; El-Fellaki, E.; Mousahel, R.; Bouachra, H.; Lakhal, A., 2009. Epidemiological retrospective survey intestinal parasitism in the Provincial Hospital Center (Kenitra, Morocco): a review of 10 years (1996-2005). *Annales de Biologie Clinique*, **67**: 191-202.
- Eligio-García, L.; Cortés-Campos, A.; Jiménez-Cardoso, E., 2005. Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *Parasitology Research*, **97**: 1-6.
- Elwin, K.; Chalmers, R.M., 2008. Contemporary identification of previously reported novel *Cryptosporidium* isolates reveals *Cryptosporidium bovis* and the cervine genotype in sheep (*Ovis aries*). *Parasitology Research*, **102**: 1103-1105.
- Endeshaw, T.; Mohammed, H.; Woldemichael, T., 2004. *Cryptosporidium parvum* and other intestinal parasites among diarrhoeal patients referred to EHNRI in Ethiopia. *Ethiopian Medical Journal*, **42**: 195-198.
- Enríquez, C.; Nwachuku, N.; Gerba, C.P., 2001. Direct exposure to animal enteric pathogens. *Reviews of Environmental Health*, **16**: 117-131.

- Erlansen, S.L.; Bemrick, W.J., 1987. SEM evidences for a new species *Giardia psittaci*. *Journal for Parasitology*, **73**: 623-629.
- Erlansen, S.L.; Bemrick, W.J.; Wells, C.L.; Feely, D.E.; Knudson, L.; Campbell, S.R.; van Keulen, H.; Jarroll, E.L., 1990. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). *Journal of Parasitology*, **76**: 717-724.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2011. Annual epidemiological report: reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. <http://www.ecdc.europa.eu/>.
- Farizawati, S.; Lim, A.Y.L.; Ahmad, R.A.; Fatimah, C.T.N.I.; Siti-Nor, Y., 2005. Contribution of cattle farms towards river contamination with *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Sungai Langat Basin. *Tropical Biomedicine*, **22**: 89-98.
- Fayer, R., 1994. Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Applied an Environmental Microbiology*, **60**: 2732-2735.
- Fayer, R., 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, **126**: 37-56.
- Fayer, R., 2008. General biology. *En: Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Fayer, R.; Xiao, L. (Eds.), CRC Press, pp. 1-42.
- Fayer, R., 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, **124**: 90-97.
- Fayer, R.; Ellis, W., 1993. Paromomycin is effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves. *Journal of Parasitology*, **79**: 771-774.
- Fayer, R.; Santín, M., 2009. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*, **164**: 192-200.
- Fayer, R.; Speer, C.A.; Dubey, J.P., 1997. The general biology of *Cryptosporidium*. *En: Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Fayer, R. (Ed.), CRC Press, pp. 1-41.
- Fayer, R.; Gasbarre, L.; Pasquali, P.; Canals, A.; Almería, S.; Zarlenga, D., 1998a. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *International Journal for Parasitology*, **28**: 49-56.
- Fayer, R.; Trout, J.M.; Jenkins, M.C., 1998b. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology*, **84**: 1165-1169.
- Fayer, R.; Morgan, U.; Upton, S.J., 2000a. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1305-1322.
- Fayer, R.; Trout, J.M.; Graczyk, T.K.; Lewis, E.J., 2000b. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. *Veterinary Parasitology*, **93**: 103-112.
- Fayer, R.; Trout, J.M.; Walsh, E.; Cole, R., 2000c. Rotifers ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **47**: 161-163.
- Fayer, R.; Trout, J.M.; Xiao, L.; Morgan, U.M.; Lai, A.A.; Dubey, J.P., 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *Journal of Parasitology*, **87**: 1415-1422.
- Fayer, R.; Dubey, J.P.; Lindsay, D.S., 2004. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends in Parasitology*, **20**: 531-536.
- Fayer, R.; Santín, M.; Xiao, L., 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal of Parasitology*, **91**: 624-629.

- Fayer, R.; Santín, M.; Trout, J.M.; DeStefano, S.; Koenen, K.; Kaur, T., 2006a. Prevalence of Microsporidia, *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in beavers (*Castor canadensis*) in Massachussets. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **37**: 492-497.
- Fayer, R.; Santín, M.; Trout, J.M.; Greiner, E., 2006b. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Veterinary Parasitology*, **135**: 105-112.
- Fayer, R.; Santín, M.; Trout, J.M., 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Veterinary Parasitology*, **145**: 260-266.
- Fayer, R.; Santín, M.; Trout, J.M., 2008. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, **156**: 191-198.
- Fayer, R.; Santín, M.; Dargatz, D., 2010a. Species of *Cryptosporidium* detected in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. *Veterinary Parasitology*, **170**: 187-192.
- Fayer, R.; Santín, M.; Macarisin, D., 2010b. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology*, **172**: 23-32.
- Feachem, R.G.; Bradley, D.J.; Garelick, H.; Mara, D.D., 1983. Sanitation and disease: health aspects of excreta and wastewater management. World Bank Studies in Water Supply and Sanitation (Eds.), John Wiley and Sons, ISBN: 0-47-90094-X, 534 pp.
- Feltus, D.C.; Giddings, C.W.; Schneck, B.L.; Monson, T.; Warshauer, D.; McEvoy, J.M., 2006. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* in Winsconsin. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**: 4303-4308.
- Feltus, D.C.; Giddings, C.W.; Khaita, M.L.; McEvoy, J.M., 2008. High prevalence of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in calves compared to mature cows in beef cow-calf operations. *Veterinary Parasitology*, **151**: 191-195.
- Feng, Y., 2010. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. *Experimental Parasitology*, **126**: 37-56.
- Feng, Y.; Xiao, L., 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, **24**: 110-140.
- Feng, Y.; Alderisio, K.A.; Yang, W.; Blancero, L.A.; Kuhne, W.G.; Nadareski, C.A.; Reid, M.; Xiao, L., 2007a. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 6475-6483.
- Feng, Y.; Ortega, Y.; He, G.; Das, P.; Xu, M.; Zhang, X.; Fayer, R.; Gatei, W.; Cama, V.; Xiao, L., 2007b. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Veterinary Parasitology*, **144**: 1-9.
- Fernández García, J.R.; Aguilar Cano, R., 1988. Giardiasis en la infancia. Estudio a nivel ambulatorio. *Revista Española de Pediatría*, **44**: 73-76.
- Filice, F.P., 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *University of California Publications in Zoology*, **57**: 53-146.
- Fleta, J.; Sánchez-Acedo, C.; Clavel, A.; Quílez, J., 1995. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extraintestinal tissues of sheep and pigs. *Veterinary Parasitology*, **59**: 201-205.
- Flórez, A.C.; García, D.A.; Moncada, L.; Beltrán, M., 2003. Prevalence of microsporidia and other intestinal parasites in patients with HIV infection, Bogota, 2001. *Biomedica*, **23**: 274-282.

- Fontán Sainz, M., 2012. *Cryptosporidium* en la desinfección solar del agua de bebida. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, 174 pp.
- Foronda, P.; Bargues, M.D.; Abreu-Costa, N.; Periago, M.V.; Valero, M.A.; Valladares, B.; Mas-Coma, S., 2008. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human in Egypt. *Parasitology Research*, **103**: 1177-1181.
- Freire-Santos, F.; Oteiza-López, A.M.; Vergara-Castiblanco, C.A.; Ares-Mazás, M.E., 1999. Effect of salinity, temperature and storage time on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum*. *Veterinary Parasitology*, **87**: 1-7.
- Freire-Santos, F.; Oteiza-López, A.M.; Vergara-Castiblanco, C.A.; Ares-Mazás, E., 2000a. Study of the combined influence of environmental factors on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water evaluated by fluorogenic vital dyes and excystation techniques. *Veterinary Parasitology*, **89**: 253-259.
- Freire-Santos, F.; Oteiza-López, A.M.; Vergara-Castiblanco, C.A.; Ares-Mazás, M.E.; Álvarez-Suárez, E.; García-Martín, O., 2000b. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve mollusc destined for human consumption. *Journal of Parasitology*, **86**: 853-854.
- Freire-Santos, F.; Oteiza-López, A.M.; Castro-Hermida, J.A.; García-Martín, O.; Ares-Mazás, M.E., 2001. Viability and infectivity of oocysts recovered from clams, *Ruditapes philippinarum*, experimentally contaminated with *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology Research*, **87**: 428-430.
- Fu, C.Y.; Xie, X.; Huang, J.J.; Zhang, T.; Wu, Q.Y.; Chen, J.N.; Hu, H.Y., 2010. Monitoring and evaluation of removal of pathogens at municipal wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*, **61**: 1589-1599.
- Fundación SODIS, 2012. <http://sitio.fundacionsodis.org/>.
- Galmes, A.; Nicolau, A.; Arbona, A.; Gomis, E.; Guma, M.; Smith-Palmer, A.; Hernández-Pezzi, G.; Soler, P., 2003. Cryptosporidiosis outbreak in British tourists who stayed at a hotel in Majorca, Spain. <http://www.eurosurveillance.org>.
- García-López, J.A.; García-López, M.A.; Valero, A., 1989. Parasitismo intestinal en la población infantil de la Vega de Granada. *Revista Española de Pediatría*, **45**: 307-310.
- García Martos, P.; Moreno, B.; Romero, P.; Pimentel, R.; Muñoz, C.; Fernández, M.L.; García de Lomas, M.O., 1989. Parasitación intestinal por protozoos en niños de la bahía de Cádiz. *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, **63**: 79-84.
- García-Martos, P.; Castaño, M.A.; Fernández, S.; García-Herruzo, J., 1992. Análisis de 145 casos de cryptosporidiosis en niños. *Revista de Diagnóstico Biológico*, **41**: 20-22.
- García-Rodríguez, J.A.; Martín-Sánchez, A.M.; Pérez-Zaballos, M.I., 1985. Incidencia de parasitismos intestinales humanos en la provincia de Salamanca. *Revista Ibérica de Parasitología*, **45**: 129-139.
- García-Rodríguez, J.A.; Martín, A.M.; Canut, A.; García, I.; Arce, J.J., 1988. Giardiasis: análisis de 618 casos durante el período 1979-1986. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **6**: 50-53.
- García-Rodríguez, J.A.; Martín-Sánchez, A.M.; Canut-Blasco, A.; García-Luis, E.J., 1990. The prevalence of *Cryptosporidium* species in children in a day care centres and primary schools in Salamanca (Spain): an epidemiological study. *European Journal of Epidemiology*, **6**: 432-435.
- Gardner, T.B.; Hill, D.R., 2001. Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**: 114-128.
- Gargala, G., 2008. Drug treatment and novel drug target against *Cryptosporidium*. *Parasite*, **15**: 275-281.

- Gascón, J., 2006. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. *Digestion*, **73**: 102-108.
- Gatei, W.; Suputtamongkol, Y.; Waywa, D.; Ashford, R.W.; Bailey, J.W.; Greensill, J.; Beeching, N.J.; Hart, C.A., 2002. Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **96**: 797-802.
- Gatei, W.; Wamae, C.N.; Mbae, C.; Waruru, A.; Mulinge, E.; Waithera, T.; Gatika, S.M.; Kamwati, S.K.; Revathi, G.; Hart, C.A., 2006. Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **75**: 78-82.
- Gatei, W.; Barret, D.; Lindo, J.F.; Eldemire-Shearer, D.; Cama, V.; Xiao, L., 2008. Unique *Cryptosporidium* population in HIV-infected persons, Jamaica. *Emerging Infectious Diseases*, **14**: 841-843.
- Gatell, J.M.; Clotet, B.; Podzamoz, D., 1996. Historia natural y clasificación de la infección por VIH-1. En: Guía práctica del SIDA. Masson (Ed.), 26 pp.
- Gaut, S.; Robertson, L.; Gjerde, B.; Dagestad, A.; Bratti, B., 2008. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in Norwegian groundwater wells in bedrock. *Journal of Water and Health*, **6**: 383-388.
- Gaydos, J.K.; Miller, A.W.; Kreuder-Johnson, C.; Zornetzer, H.; Melli, A.C.; Packham, A.E.; Jeffries, S.J.; Lance, M.M.; Conrad, P.A., 2008. Novel and canine genotypes of *Giardia duodenalis* in harbour seals (*Phoca vitulina richardsi*). *Journal of Parasitology*, **94**: 1264-1268.
- Gbakima, A.A.; Konteh, R.; Kallon, M.; Mansaray, H.; Sahr, F.; Bah, Z.J.; Spencer, A.; Luckay, A., 2007. Intestinal protozoa and intestinal helminth in displacement camps in Sierra Leone. *African Journal of Medicine and Medical Sciences*, **36**: 1-9.
- Gelanew, T.; Lalle, M.; Haillu, A.; Pozio, E.; Cacciò, S.M., 2007. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Tropica*, **102**: 92-99.
- Gerwig, G.J.; van Kuik, J.A.; Leeflang, B.R.; Kamerling, J.P.; Vliegthart, J.F.; Karr, C.D.; Jarroll, E.L., 2002. The *Giardia intestinalis* filamentous cysts wall contains a novel beta (1-3)-N-acetyl-D-galactosamine polymer: a structural and conformational study. *Glycobiology*, **12**: 499-505.
- Geurden, T.; Olson, M., 2011. *Giardia* in pets and farm animals, and their zoonotic potential. En: *Giardia* a model organism. Luján, H.D.; Svärd, S. (Eds.), SpringerWienNewYork, pp. 71-92.
- Geurden, T.; Thomas, P.; Casaert, S.; Vercruysse, J.; Claerebout, E., 2008. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. *Veterinary Parasitology*, **155**: 142-145.
- Geurden, T.; Levecke, B.; Cacciò, S.M.; Visser, A.; de Groote, G.; Casaert, S.; Vercruysse, J.; Claerebout, E., 2009. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. *Parasitology*, **136**: 1161-1168.
- Ghosh, M.; Pathak, S.; Ganguli, A., 2009. Effective removal of *Cryptosporidium* by a novel bioflocculant. *Water Environment Research*, **81**: 160-164.
- Giangaspero, A.; Berrilli, F.; Brandonisio, O., 2007. *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. *Parasitology Research*, **101**: 1169-1182.
- Giangaspero, A.; Cirillo, R.; Lacasella, V.; Lonigro, A.; Marangi, M.; Cavallo, P.; Berrilli, F.; Di Cave, D.; Brandonisio, O., 2009. *Giardia* and *Cryptosporidium* in inflowing water and harvested shellfish in a Lagoon in Southern Italy. *Parasitology International*, **58**: 12-17.



- Gillin, F.D.; Reiner, D.S.; Gault, M.J.; Douglas, H.; Das, S.; Wunderlich, A.; Sauch, J.F., 1987. Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro. *Science*, **235**: 1040-1043.
- Glaeser, C.; Grimm, F.; Mathis, A.; Weber, R.; Nadal, D.; Deplazes, P., 2004. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from diarrheic children in Switzerland. *Pediatric Infectious Disease Journal*, **23**: 359-361.
- Gleeson, M.T., 2000. The plastid in Apicomplexa: what use is it?. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1053-1070.
- Göebel, E.; Brandler, U., 1982. Ultrastructure of microgametogenesis, microgamete and gametogony of *Cryptosporidium* sp. in the small intestine of mice. *Protistologica*, **18**: 331-334.
- Goiriena de Gandarias, F.J.; Barranquero Arola, M.; Gorritxo Gil, B., 1983. Estudio de parásitos en heces procedentes de población escolar. *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, **57**: 959-967.
- Goma, F.Y.; Geurden, T.; Siwila, J.; Phiri, I.G.K.; Gabriel, S.; Claerebout, E.; Vercruysse, J., 2007. The prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* spp. in small ruminants in Zambia. *Small Ruminant Research*, **72**: 77-80.
- Gómez-Bautista, M.; Ortega-Mora, L.M.; Gass, A.; Troncoso, J.M.; Rojo-Vázquez, F.A., 1989. Epizootiología de la cryptosporidiosis en rumiantes (terneros, corderos y cabritos). VI Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología. Cáceres, España, *Libro de Comunicaciones*, p. 187.
- Gómez-Bautista, M.; Ortega-Mora, L.M.; Tabares, E.; López-Rodas, V.; Costas, E., 2000. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 1866-1870.
- Gómez-Couso, H.; Freire-Santos, F.; Martínez-Urtaza, J.; García-Martín, O.; Ares-Mazás, M.E., 2003. Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts; the need for new quality control standards. *International Journal of Food Microbiology*, **87**: 97-105.
- Gómez-Couso, H.; Freire-Santos, F.; Amar, C.F.; Grant, K.A.; Williamson, K.; Ares-Mazás, M.E.; McLauchlin, J., 2004a. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, **91**: 279-288.
- Gómez-Couso, H.; Méndez-Hermida, F.; Castro-Hermida, J.A.; Pereira-Lorenzo, A.; Ares-Mazás, E., 2004b. Report about an outbreak of cryptosporidiosis in a nursery centre of Santiago de Compostela (NW-Spain). *IX European Multicollloquium of Parasitology*. Valencia, España, p. 486.
- Gómez-Couso, H.; Méndez-Hermida, F.; Castro-Hermida, J.A.; Ares-Mazás, E., 2005. *Giardia* in shellfish-farming areas: detection in mussels, river water and waste waters. *Veterinary Parasitology*, **133**: 13-18.
- Gómez-Couso, H.; Méndez-Hermida, F.; Castro-Hermida, J.A.; Ares-Mazás, E., 2006a. *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. *Journal of Food Protection*, **69**: 185-190.
- Gómez-Couso, H.; Méndez-Hermida, F.; Castro-Hermida, J.A.; Ares-Mazás, E., 2006b. Cooking mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by steam does not destroy the infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Food Protection*, **69**: 948-950.
- Gómez-Couso, H.; Fontán-Sainz, M.; Fernández-Alonso, J.; Ares-Mazás, E., 2009. Excystation of *Cryptosporidium parvum* at temperatures that are reached during solar water disinfection. *Parasitology*, **136**: 393-399.



- Gómez-Muñoz, M.T.; Navarro, C.; Garijo-Toledo, M.M.; Dea-Ayuela, M.A.; Fernández-Barredo, S.; Pérez-Gracia, M.T.; Domínguez-Márquez, M.V.; Borrás, R., 2009. Occurrence and genotypes of *Giardia* isolated from lambs in Spain. *Parasitology International*, **58**: 297-299.
- Gómez-Muñoz, M.T.; Cámara-Badenes, C.; Martínez-Herrero, M.C.; Dea-Ayuela, M.A.; Pérez-Gracia, M.T.; Fernández-Barredo, S.; Santín, M.; Fayer, R., 2012. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in lambs from Spain reveals a high heterogeneity. *Research in Veterinary Science*, doi: 10.016/j.rvsc.2011.12.012.
- Gonçalves, A.C.M.; Gabbay, Y.B.; D'arc-Mascarenhas, J.; Yassaka, M.B.; Moran, L.C.; Fraga, V.D.; Castro, E.; Franco, C.; Machado, R.L.D.; Rossit, A.R.B., 2009. Short report: Calicivirus and *Giardia lamblia* are associated with diarrhea in human immunodeficiency virus-seropositive patients from southeast Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **81**: 463-466.
- González, E.; Respaliza, E., 1987. Incidencia de la cryptosporidiosis en ovinos y caprinos. V Congreso Nacional de Parasitología. Salamanca, España. *Libro de Comunicaciones*, pp. 293-294.
- Gofñi, P.; Aldana, D.E.; Clavel, A.; Seral, C.; Remacha, M.A.; Castillo, F.J., 2010. Prevalencia de *Giardia duodenalis* genotipo B en humanos en Zaragoza y León, España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **28**: 710-712.
- Graczyk, T.K., 2005. Is *Giardia* a living fossil?. *Trends in Parasitology*, **21**: 104-107.
- Graczyk, T.K.; Cranfield, M.R.; Fayer, R.; Anderson, M.S., 1996. Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts are retained upon intestinal passage through a refractory avian host. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 3234-3237.
- Graczyk, T.K.; Cranfield, M.R.; Fayer, R.; Trout, J.; Goodale, H.J., 1997. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts is retained upon intestinal passage through a migratory waterfowl species (Canada goose, *Branta canadensis*). *Tropical Medicine and International Health*, **2**: 341-347.
- Graczyk, T.K.; Evans, B.M.; Shiff, C.J.; Karreman, H.J.; Patz, J.A., 2000. Environmental and geographical factors contributing to watershed contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Environmental Research*, **82**: 263-271.
- Graczyk, T.K.; Lucy, F.E.; Tamang, L.; Miraflor, A., 2007. Human enteropathogen load in activated sewage sludge and corresponding sewage end products. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 2013-2015.
- Graczyk, T.K.; Majewska, A.C.; Schwab, K.J., 2008. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. *Trends in Parasitology*, **24**: 55-59.
- Graczyk, T.K.; Lucy, F.E.; Tamang, L.; Mashinski, Y.; Broaders, M.A.; Connolly, M.; Cheng, H.W., 2009. Propagation of human enteropathogens in constructed horizontal wetlands used for tertiary wastewater treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 4531-4538.
- Guk, S.M.; Seo, M.; Park, Y.K.; Oh, M.D.; Choe, K.W.; Kim, J.L.; Choi, M.H.; Hong, S.T.; Chain, J.Y., 2005. Parasitic infections in HIV-infected patients who visited Seoul National University Hospital during the period 1995-2003. *Korean Journal of Parasitology*, **43**: 1-5.
- Gutiérrez, J.F.; Gálmez, M.; Castella, J.; Muñoz, E.; Cuadras, C., 1991. Datos preliminares sobre la epidemiología de la cryptosporidiosis del ganado vacuno en Cataluña. I Congreso Internacional de las Asociaciones Sudoccidental-Europeas de Parasitología (ICASEP I). Valencia, España, *Libro de Comunicaciones*, p. 404.

- Guyot, K.; Follet-Dumoulin, A.; Lelièvre, E.; Sarfati, C.; Rabodonirina, M.; Nevez, G.; Cailliez, J.C.; Camus, D.; Dei-Cas, E., 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**: 3472-3480.
- Haas, C.N.; Kaymak, B., 2003. Effect of initial microbial density on inactivation of *Giardia muris* by ozone. *Water Research*, **37**: 2980-2988.
- Hajdu, A.; Vold, L.; Østmo, T.A.; Helleve, A.; Helgebostad, S.R.; Krogh, T.; Robertson, L.; de Jong, B.; Nyård, K., 2008. Investigation of Swedish cases reveals an outbreak of cryptosporidiosis at a Norwegian hotel with possible links to in-house water systems. *BMC Infectious Diseases*, **8**: 152.
- Hamnes, I.S.; Gjerde, B.; Robertson, L., 2006a. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Veterinary Parasitology*, **140**: 204-216.
- Hamnes, I.S.; Gjerde, B.; Robertson, L.; Vikøren, T.; Handeland, K., 2006b. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in free-ranging wild cervids in Norway. *Veterinary Parasitology*, **141**: 30-41.
- Hancock, C.M.; Rose, J.B.; Callahan, M., 1998. *Cryptosporidium* and *Giardia* in US groundwater. *Proceedings of the International Symposium on Waterborne Cryptosporidium*. Denver, Estados Unidos, pp. 147-152.
- Hancock, D.; Besser, T.; Lejeune, J.; Davis, M.; Rice, D., 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *International Journal of Food Microbiology*, **66**: 71-78.
- Hansen, J.S.; Ongerth, J.E., 1991. Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**: 2790-2795.
- Harp, J.A.; Woodmansee, D.B.; Moon, H.W., 1990. Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum*: effects of age and previous exposure. *Infection and Immunity*, **58**: 2237-2240.
- Harper, C.M.; Cowell, N.A.; Adams, B.C.; Langley, A.J.; Wholsen, T.D., 2002. Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurised milk. *Communicable Diseases Intelligence*, **26**: 449-450.
- Hashimoto, A.; Hirata, T.; Kunikane, S., 2001. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in a conventional water purification plant. *Water Science and Technology*, **43**: 89-92.
- Health Canada, 2004. Guidelines for Canadian drinking water quality: supporting documentation – Protozoa: *Giardia* and *Cryptosporidium*. Water Quality and Health Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch. Health Canada, Ottawa, Ontario.
- Heine, J.; Pohlenz, J.F.L.; Moon, H.W.; Woode, G.N., 1984. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. *Journal of Infectious Diseases*, **150**: 768-775.
- Heitman, T.L.; Frederick, L.M.; Viste, J.R.; Guselle, N.J.; Morgan, U.M.; Thompson, R.C.A.; Olson, M.E., 2002. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, **48**: 530-541.
- Hijnen, W.A.M.; Brouwer-Hanzens, A.J.; Charles, K.J.; Medema, G.J., 2005. Transport of MS2 phage, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in a gravel and a sandy soil. *Environmental Science and Technology*, **39**: 7860-7868.
- Hijnen, W.A.M.; Beerendok, E.F.; Medema, G.J., 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research*, **40**: 3-22.

- Hill, B.D.; Blewett, D.A.; Dawson, A.M.; Wright, S., 1990. Analysis of the kinetics, isotype and specificity of serum and coproantibody in lambs infected with *Cryptosporidium parvum*. *Research in Veterinary Science*, **48**: 76-81.
- Homan, W.L.; Mank, T.G., 2001. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *International Journal for Parasitology*, **31**: 822-826.
- Hoque, E.; Hope, V.; Scragg, R.; Baker, M.; Shrestha, R., 2004. A descriptive epidemiology of giardiasis in New Zealand and gaps in surveillance data. *New Zealand Medical Journal*, **117**: U1149.
- Hörman, A.; Korpela, H.; Sutinen, J.; Wedel, H.; Hanninen, M.L., 2004. Meta-analysis in assessment of the prevalence and annual incidence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. infections in humans in the Nordic countries. *International Journal for Parasitology*, **34**: 1337-1346.
- Haupt, E.R.; Bushen, O.Y.; Sam, N.E.; Kohli, A.; Asgharpour, A.; Ng, C.T.; Calfee, D.P.; Guerrant, R.L.; Maro, V.; Ole-Nguyaine, S.; Shao, J.F., 2005. Short report: asymptomatic *Cryptosporidium hominis* infection among human immunodeficiency virus-infected patients in Tanzania. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**: 520-522.
- Huamanchay, O.; Genzlinger, L.; Iglesias, M.; Ortega, Y.R., 2004. Ingestion of *Cryptosporidium* oocysts by *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Parasitology*, **90**: 1176-1178.
- Huang, D.B.; White, A.C., 2006. An update review of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterology Clinics of North America*, **35**: 291-314.
- Huetink, R.E.C.; van der Giessen, J.W.B.; Noordhuizen, J.P.T.M.; Ploeger, H.W., 2001. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Veterinary Parasitology*, **102**: 53-67.
- Hunter, P.R.; Thompson, R.C.A., 2005. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, **35**: 1181-1190.
- Hunter, P.R.; Hadfield, S.J.; Wilkinson, D.; Lake, I.R.; Harrison, F.C.; Chalmers, R.M., 2007. Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk. *Emerging Infectious and Diseases*, **13**: 82-88.
- Illescas, M.P.; Llamas, R.; Ardoy, L.; Llamasa, A., 1993. Cryptosporidiosis en ovinos y caprinos en la provincia de Granada (España). III Congreso Ibérico de Parasitología. Lisboa, Portugal, *Acta Parasitologica Portuguesa*, **1**: 198.
- Indest, K., 2003. Interim guidance on assessing the risk posed by pathogens associated with dredged material. Nº ERDC/TN EEDP-01-49.
- Isaac-Renton, J.; Moorehead, W.; Ross, A., 1996. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two community drinking water supplies: cysts levels, parasite viability and health impact. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 47-54.
- Iseki, M., 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa, Eimeriorina) from the domestic cat. *Japan Journal of Parasitology*, **28**: 285-307.
- Ives, N.J.; Gazzard, B.G.; Easterbrook, P.J., 2001. The changing pattern of AIDS-defining illnesses with the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) in a London clinic. *Journal of Infection*, **42**: 134-139.
- Jarroll, E.L.; Bingham, A.K.; Meyer, E.A., 1981. Effect of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability. *Applied and Environmental Microbiology*, **41**: 483-487.

- Jenkins, M.B.; Anguish, L.J.; Bowman, D.D.; Walker, M.J.; Ghiorse, W.C., 1997. Assessment of a dye permeability assay for determination of inactivation rates of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 3844-3850.
- Jenkins, M.; Walker, M.J.; Bowman, D.D.; Anthony, L.C.; Ghiorse, W.C., 1999. Use of a sentinel system for field measurements of *Cryptosporidium parvum* oocysts inactivation in soil and animal waste. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 1998-2005.
- Jenkins, M.B.; Bowman, D.D.; Fogarty, E.A.; Ghiorse, W.C., 2002. *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in three soils types at various temperatures and water potentials. *Soil Biology and Biochemistry*, **34**: 1101-1109.
- Jhonson, D.C.; Enriquez, C.E.; Pepper, I.L.; Gerba, C.P.; Rose, J.B., 1997. Survival of *Giardia*, *Cryptosporidium*, Poliovirus and *Salmonella* in marine waters. *Water Science and Technology*, **35**: 261-268.
- Jhonston, A.R.; Gillespie, T.R.; Rwego, I.B.; McLachlan, T.L.T.; Kent, A.D.; Goldberg, T.L., 2010. Molecular epidemiology of cross-species *Giardia duodenalis* transmission in Western Uganda. *Plos Neglected Tropical Diseases*, **4**: e683.
- Jirků, M.; Valigurová, A.; Koudela, B.; Krízek, J.; Modry, D.; Slapeta, J., 2008. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica*, **55**: 81-94.
- Johnson, D.C.; Reynolds, K.A.; Gerba, C.P.; Pepper, I.L.; Rose, J.B., 1995. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. *Water Science and Technology*, **31**: 439-442.
- Jokipii, L.; Jokipii, A.M.M., 1986. Timing of symptoms and oocysts excretion in human cryptosporidiosis. *New England Journal of Medicine*, **315**: 1643-1647.
- Joyce, T.M.; McGuigan, K.G.; Elmore-Meegan, M.; Conroy, R.M., 1996. Inactivation of fecal bacteria in drinking water by solar heating. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 399-402.
- Juste, R.A.; García, A.L.; Gelabert, J.L.; González, L.; Marco, J., 1987. Presencia de *Cryptosporidium* spp. en casos de diarreas neonatales de rumiantes. II Jornadas sobre Producción Animal. Zaragoza, España, **7**: 256-258.
- Karanis, P.; Opiela, K.; Renoth, S.; Seitz, H.M., 1996. Possible contamination of surface waters with *Giardia* spp. through muskrats. *International Journal of Medical Microbiology*, **284**: 302-306.
- Karanis, P.; Papadopolou, C.; Kimua, A.; Economou, E.; Kourenti, C.; Sakkas, H., 2002. *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural, drinking and recreational water of northwestern Greece. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, **30**: 49-58.
- Karanis, P.; Sotiriadou, I.; Kartashev, V.; Kourenti, C.; Tsvetkova, N.; Stojanova, K., 2006. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environmental Research*, **102**: 260-271.
- Karanis, P.; Kourenti, C.; Smith, H., 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health*, **5**: 1-38.
- Kashyap, B.; Sinha, S.; Das, S.; Rustagi, N.; Jhamb, R., 2010. Efficiency of diagnostic methods for correlation between prevalence of enteric protozoan parasites and HIV/AIDS status- an experience of a tertiary care hospital in East Delhi. *Journal of Parasitic Diseases*, **34**: 63-67.
- Kato, S.; Jenkins, M.B.; Fogarty, E.A.; Bowman, D.D., 2002. Effects of freeze-thaw events on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in soil. *Journal of Parasitology*, **88**: 718-722.

- Keegan, A.; Daminato, D.; Saint, C.P.; Monis, P.T., 2008. Effect of water treatment processes on *Cryptosporidium* infectivity. *Water Research*, **42**: 1805-1811.
- Keely, A.; Faulkner, B.R., 2008. Influence of land use and watershed characteristics on protozoa contamination in a potential drinking water resources reservoir. *Water Research*, **42**: 2803-2813.
- Keithly, J.S.; Zhu, G.; Upton, S.J.; Woods, K.M.; Martínez, M.P.; Yarlett, N., 1997. Polyamine-biosynthesis in *Cryptosporidium parvum* and its implications for chemotherapy. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **88**: 35-42.
- Kelly, S.; Sanderson, W.W., 1960. The effect of chlorine in water on enteric viruses. The effect of combined chlorine on poliomyelitis and Coxsackie viruses. *American Journal of Public Health*, **50**: 119.
- Keshavarz, A.; Haghighi, A.; Athari, A.; Kazemi, B.; Abadi, A.; Nazemalhosseini Mojarad, E., 2009. Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* in Qazvin province, Iran. *Veterinary Parasitology*, **160**: 316-318.
- King, B.J.; Hoefel, D.; Daminato, D.P.; Fanok, S.; Monis, P.T., 2008. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. *Journal of Applied Microbiology*, **104**: 1311-1323.
- Kistemann, T.; Claßen, T.; Koch, C.; Dangendorf, F.; Fischeider, R.; Gebel, J.; Vacata, V.; Exner, M., 2002. Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 2188-2197.
- Kofoed, C.A., 1920. A critical review of the nomenclature of human intestinal flagellates, *Cercomonas*, *Chilomastix*, *Trichomonas*, *Tetratrichomonas* and *Giardia*. *University of California Publications in Zoology*, **20**: 145-168.
- Kofoed, C.A.; Christiansen, E.B., 1915. On binary and multiple fission in *Giardia muris* (Grassi). *University of California Publications in Zoology*, **16**: 30-54.
- Korich, D.G.; Mead, J.R.; Madore, M.S.; Sinclair, N.A.; Sterling, C.R., 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocysts viability. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 1423-1428.
- Korshlom, H.; Henriksen, S.A., 1984. Infection with *Cryptosporidium* in roe deer (*Capreolus capreolus* L.). A preliminary report. *Nordisk Veterinær Medicin*, **36**: 266.
- Koudela, B.; Vítovec, J., 1998. Experimental giardiasis in goat kids. *Veterinary Parasitology*, **74**: 9-18.
- Kunstler, J., 1882. Sur cinq protozoaires nouveaux. *Comptes Rendus de Séances de la Société de Biologie et de Ses Filiales*, **95**: 347-349.
- Lalancette, C.; Gagnéux, M.; Mailly, J.; Servais, P.; Côté, C.; Michaud, A.; Di Giovanni, G.D.; Prévost, M., 2012. Total and infectious *Cryptosporidium* oocyst and total *Giardia* cyst concentrations from distinct agricultural and urban contamination sources in Eastern Canada. *Journal of Water and Health*, **10**: 147-160.
- Lalle, M.; Pozio, E.; Capelli, G.; Bruschi, F.; Crotti, D.; Cacciò, S.M., 2005. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *International Journal for Parasitology*, **35**: 207-213.
- Lalle, M.; Bruschi, F.; Castagna, B.; Campa, M.; Pozio, E.; Cacciò, S.M., 2009. High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from Saharawi children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **103**: 834-838.

- Lambl, W., 1859. Mikroskopische untersuchungen der darm-excrete. *Vierteljahrsschrift Prak Heikunde*, **61**: 1-58.
- Lane, S.; Lloyd, D., 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Critical Reviews in Microbiology*, **28**: 123-147.
- Langkjær, R.B.; Vigre, H.; Enemark, H.L.; Maddox-Hyttel, C., 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology*, **134**: 339-350.
- Lasek-Nesselquist, E.; Welch, D.M.; Sogin, M.L., 2010. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *International Journal for Parasitology*, **40**: 1063-1074.
- Leahy, J.G.; Rubin, A.L.; Sproul, O.J., 1987. Inactivation of *Giardia muris* cysts by free chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**: 1448-1453.
- Learmonth, J.J.; Ionas, G.; Ebbett, K.A.; Kwan, E.S., 2004. Genetic characterization and transmission cycles of *Cryptosporidium* species isolated from humans in New Zealand. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 3973-3978.
- Lebbad, M.; Mattsson, J.G.; Christensson, B.; Ljungström, B.; Backhans, A.; Andersson, J.O.; Svärd, S.G., 2010. From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Veterinary Parasitology*, **150**: 33-38.
- LeChevallier, M.W.; Norton, W.D.; Lee, R.G., 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**: 2610-2616.
- Leek, R.G.; Fayer, R., 1984. Prevalence of *Cryptosporidium* infections, and their relation to diarrhea in calves on 12 dairy farms in Maryland. *Proceedings of the Helminthology Society of Washington*, **51**: 360-361.
- Lefay, D.; Naciri, M.; Poirier, P.; Chermette, R., 2001. Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves. *Veterinary Record*, **148**: 108-112.
- Legnani, P.P.; Leoni, E.; Baraldi, M.; Pinelli, G.; Bisbini, P., 1996. Evaluation disinfection treatment systems for municipal wastewater reclamation and reuse. *International Journal of Hygiene and Environmental Medicine*, **198**: 552-566.
- Leonhard, S.; Pfister, K.; Beelitz, P.; Wielinga, C.; Thompson, R.C.A., 2007. The molecular characterization of *Giardia* from dogs in southern Germany. *Veterinary Parasitology*, **150**: 33-38.
- Leoni, F.; Amar, C.; Nichols, G.; Pedraza-Díaz, S.; McLauchlin, J., 2006. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhea in England between 1985 and 2000. *Journal of Medical Microbiology*, **55**: 703-707.
- Levine, N.D.; Corliss, J.O.; Cox, F.E.; Deroux, G.; Grain, J.; Honigberg, B.M.; Leedale, G.F.; Loeblich, A.R. III; Lom, J.; Lynn, D.; Merinfeld, E.G.; Page, F.C.; Poljansky, G.; Sprauge, V.; Vavra, J.; Wallace, F.G., 1980. A newly revised classification of the protozoa. *Journal of Protozoology*, **27**: 37-58.
- Levy, D.A.; Bens, M.S.; Craun, G.F.; Calderon, R.L.; Herwaldt, B.L., 1998. Surveillance for waterborne disease outbreaks- United States, 1995-1996. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summary*, **47**: 1-34.
- Li, X.; Atwill, E.R.; Dunbar, L.A.; Jones, T.; Hook, J.; Tate, K.W., 2005. Seasonal temperature fluctuations induces rapid inactivation of *Cryptosporidium parvum*. *Environmental Science and Technology*, **39**: 4484-4489.



- Li, D.; Craik, S.A.; Smith, D.W.; Belosevic, M., 2009. Infectivity of *Giardia lamblia* cysts obtained from wastewater treated with ultraviolet light. *Water Research*, **43**: 3037-3046.
- Lim, Y.A.L.; Hafiz, W.; Nissapatorn, V., 2007. Reduction of *Cryptosporidium* and *Giardia* by sewage treatment process. *Tropical Biomedicine*, **24**: 95-104.
- Lim, Y.A.L.; Iqbal, A.; Surin, J.; Sim, B.L.H.; Jex, A.R.; Nolan, M.J.; Smith, H.V.; Gasser, R.B., 2011. First genetic classification of *Cryptosporidium* and *Giardia* from HIV/AIDS patients in Malaysia. *Infection Genetics and Evolution*, **11**: 968-974.
- Lindsay, D.S.; Blagburn, B.L., 1990. Cryptosporidiosis in birds. En: *Cryptosporidiosis of man and animals*. Dubey, J.P.; Speer, C.A.; Fayer, R. (Eds.), CRC Press, pp. 133-148.
- Lindsay, D.S.; Blagburn, B.L.; Hoerr, F.J.; Giambone, J.J., 1987. Experimental *Cryptosporidium baileyi* infections in chickens and turkeys produced by ocular inoculation of oocysts. *Avian Diseases*, **31**: 355-357.
- Lindsay, D.S.; Upton, S.J.; Owens, D.S.; Morgan, U.M.; Mead, J.R.; Blagburn, B.L., 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **47**: 91-95.
- Llorente, M.T.; Clavel, A.; Goñi, M.P.; Varea, M.; Seral, C.; Becerril, R.; Suárez, L.; Gómez-Lus, 2007. Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitology International*, **56**: 201-205.
- López Brea, M.; Barreno, M.; Guitiérrez, G.; Gómez, A., 1982. *Giardia lamblia* como microorganismo productor de cuadros diarreicos. *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, **56**: 277-284.
- López-Vélez, R.; Tarazona, R.; García-Camacho, A.; Gómez-Mampaso, E.; Guerrero, A.; Moreira, V.; Villanueva, R., 1995. Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **14**: 677-681.
- Lorenzo-Lorenzo, M.J.; Ares-Mazás, M.E.; Villacorta-Martínez de Maturana, I., 1993a. Detection of oocysts and IgG antibodies to *Cryptosporidium parvum* in asymptomatic adult cattle. *Veterinary Parasitology*, **47**: 9-15.
- Lorenzo-Lorenzo, M.J.; Ares-Mazás, M.E.; Villacorta-Martínez de Maturana, I.; Durán-Oreiro, D., 1993b. Effect of ultraviolet disinfection of drinking water on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Parasitology*, **79**: 67-70.
- Mac Kenzie, W.R.; Hoxie, N.J.; Proctor, M.E.; Gradus, M.S.; Blair, K.A.; Peterson, D.E.; Kazmierczak, J.J.; Addiss, D.G.; Fox, K.R.; Rose, J.B.; Davis, J.P., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine*, **331**: 161-167.
- Macarasin, D.; Bauch, G.; Fayer, R., 2010. *Spinacia oleracea* L. leaf stomata harboring *Cryptosporidium parvum* oocysts: a potential threat to food safety. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**: 555-559.
- Maddox-Hyttel, C.; Langkjær, R.B.; Enemark, H.L.; Vigre, H., 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs- Occurrence and management associated risk factors. *Veterinary Parasitology*, **141**: 48-59.
- Majewska, A.C.; Werner, A.; Sulima, P.; Luty, T., 2000. Prevalence of *Cryptosporidium* in sheep and goats bred on five farms in west-central region of Poland. *Veterinary Parasitology*, **89**: 269-275.



- Majewska, A.C.; Graczyk, T.K.; Słodkiewicz-Kowalska, A.; Tamang, L.; Jedrzejewski, S.; Zduniak, P.; Solarczyk, P.; Nowosad, A.; Nowosad, P., 2009. The role of free-ranging, captive and domestic birds of western Poland in environmental contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts. *Parasitology Research*, **104**: 1093-1099.
- Mancassola, R.; Reperant, J.M.; Naciri, M.; Chartier, C., 1995. Chemoprophylaxis of *Cryptosporidium parvum* infection with paromomycin in kids and immunological study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**: 75-78.
- Manzardo, C.; Treviño, B.; Gómez-i-Prat, J.; Cabezos, J.; Monquí, E.; Clavería, I.; Luis del Val, J.; Zabaleta, E.; Zarzuela, F.; Navarro, R., 2008. Communicable diseases in the immigrant population attended in a tropical medicine unit: epidemiological aspects and public health issues. *Travel Medicine and Infectious Disease*, **6**: 4-11.
- Mascaró, C.; Arnedo, T.; Rosales, M.J., 1994. Respiratory cryptosporidiosis in a bovine. *Journal of Parasitology*, **80**: 334-336.
- Mason, B.W.; Chalmers, R.M.; Carnicer-Pont, D.; Casemore, D.P., 2010. A *Cryptosporidium hominis* outbreak in north-west Wales associated with low oocyst counts in treated drinking water. *Journal of Water and Health*, **8**: 299-310.
- Masters, G.M., 1991. Introduction to environmental engineering and science. Prentice-Hall (Ed.), ISBN: 0134817141, 685 pp.
- Mathieu, E.; Levy, D.A.; Veverka, F.; Parrish, M.K.; Sarisky, J.; Shapiro, N.; Jhonston, S.; Handzel, T.; Hightower, A.; Xiao, L.; Lee, Y.M.; York, S.; Arrowood, M.; Lee, R.; Jones, J.L., 2004. Epidemiologic and environmental investigation of a recreational water outbreak caused by two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in Ohio in 2000. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **71**: 582-589.
- Matos, O.; Tomás, A.; Aguiar, P.; Casemore, D.; Antunes, F., 1998. Prevalence of cryptosporidiosis in AIDS patients with diarrhoea in Santa Maria Hospital, Lisbon. *Folia Parasitologica*, **45**: 163-166.
- Matos, O.; Alves, M.; Xiao, L.; Cama, V.; Antunes, F., 2004. *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, **10**: 2256-2257.
- Matos-Fernández, M.J.; Ortega-Mora, L.M.; Pereira-Bueno, J.; Pilar-Izquierdo, M.; Ferrer, I.; Rojo-Vázquez, F.A., 1993. Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium parvum* en corderos, cabritos y terneros en la provincia de León. III Congreso Ibérico de Parasitología. Lisboa, Portugal, *Acta Parasitologica Portuguesa*, **1**: 211.
- Matos-Fernández, M.J.; Ortega-Mora, L.M.; Pereira-Bueno, J.; González-Paniello, R.M.; Reguera de Castro, E.M.; Reyero-Fernández, F.; Álvarez-Pacios, C.; Rojo-Vázquez, F.A., 1994. Epidemiología de la cryptosporidiosis en el ganado ovino y caprino de la montaña de León. *Medicina Veterinaria*, **11**: 147-154.
- Mawdsley, J.L.; Brooks, A.E.; Merry, R.J., 1996. Movement of the protozoan pathogen *Cryptosporidium parvum* through three contrasting soil types. *Biology and Fertility of Soils*, **21**: 30-36.
- McGuigan, K.G.; Joyce, T.M.; Conroy, R.M.; Gillespie, J.B.; Elmore-Meegan, M., 1998. Solar disinfection of drinking water contained in transparent plastic bottles: characterizing the bacterial inactivation process. *Journal of Applied Microbiology*, **84**: 1138-1148.
- McGuigan, K.G.; Méndez-Hermida, F.; Castro-Hermida, J.A.; Ares-Mazás, E.; Kehoe, S.C.; Boyle, M.; Sichel, C.; Fernández-Ibáñez, P.; Meyer, B.P.; Ramalingham, S.; Meyer, E.A., 2006. Batch solar

- disinfection inactivates oocysts of *Cryptosporidium parvum* and cysts of *Giardia muris* in drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, **101**: 453-463.
- McLauchlin, J.; Amar, C.; Pedraza-Díaz, S.; Nichols, G.L., 2000. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**: 3984-3990.
- Mead, J.R.; Humphreys, R.C.; Sammons, D.W.; Sterling, C.R., 1990. Identification of isolate-specific sporozoite proteins of *Cryptosporidium parvum* by two-dimensional gel electrophoresis. *Infection and Immunity*, **58**: 2071-2075.
- Meisel, J.L.; Perera, D.R.; Meligro, C.; Rubin, C.E., 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, **70**: 1156-1160.
- Meloni, B.P.; Thompson, R.C.A.; Reynoldson, J.A.; Seville, P., 1990. Albendazole: a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **84**: 375-379.
- Méndez-Hermida, F.; Castro-Hermida, J.A.; Ares-Mazás, E.; Kehoe, S.C.; McGuinham, K., 2005a. Effect of Batch-Process Solar Disinfection on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 1653-1654.
- Méndez-Hermida, F.; Gómez-Couso, H.; Ares-Mazás, E., 2005b. *Artemia* is capable of spreading viable *Cryptosporidium* oocysts. *Acta Parasitologica Portuguesa*, **12**: 238
- Méndez-Hermida, F.; Ares-Mazás, E.; McGuigan, K.G.; Boile, M.; Sichel, C.; Fernández-Ibáñez, P., 2007a. Disinfection of drinking water contaminated with *Cryptosporidium parvum* oocysts under natural sunlight and using the photocatalyst TiO<sub>2</sub>. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **88**: 105-111.
- Méndez-Hermida, F.; Gómez-Couso, H.; Romero-Suances, R.; Ares-Mazás, E., 2007b. *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild otters (*Lutra lutra*). *Veterinary Parasitology*, **144**: 153-156.
- Mendonça, C.; Almeida, A.; Castro, A.; Delgado, M.L.; Soares, S.; Correia da Costa, J.M.; Canada, N., 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Veterinary Parasitology*, **147**: 47-50.
- Meyer, E.A.; Jarrol, E.J., 1980. Giardiasis. *American Journal of Epidemiology*, **111**: 1-12.
- Mercado, R.; Buck, G.A.; Manque, P.A.; Ozaki, L.S., 2007. *Cryptosporidium hominis* infection of the human respiratory tract. *Emerging Infections Diseases*, **13**: 462-464.
- Miller, W.A.; Atwill, E.R.; Gardner, I.A.; Miller, M.A.; Fritz, H.M.; Hedrick, R.P.; Melli, A.C.; Barnes, N.M.; Conrad, P.A., 2005. Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in freshwater ecosystems in California. *International Journal for Parasitology*, **35**: 673-684.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2010. <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/>.
- Ministry of Health of New Zealand, 2005. Annual review of drinking water quality in New Zealand 2003. <http://www.moh.govt.nz/water>.
- Mirzaei, M., 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. infection in diarrheic and non-diarrheic humans in Iran. *Korean Journal of Parasitology*, **45**: 133-137.

- Mitschler, R.R.; Welte, R.; Upton, S.J., 1994. A comparative study of lipid composition of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) and Madin-Darby bovine kidney cells. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **41**: 8-12.
- Mohammed Mahdy, A.K.; Surin, J.; Mohd-Adnan, A.; Wan, K.L.; Lim, Y.A.L., 2009. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* isolated from Semai Pahang Orang Asli (Peninsular Malaysia aborigines). *Parasitology*, **136**: 1237-1241.
- Mohandas, K.; Sehgal, R.; Sud, A.; Malla, N., 2002. Prevalence of intestinal parasitic pathogens in HIV-seropositive individuals in Northern India. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **55**: 83-84.
- Moles, B.; Torres, L.; Milagro, A.; Gorricho, J.; Seoane, A.; Navascues, J., 1998. Incidence of *Cryptosporidium* in Zaragoza: an 8-year study (1989-1996). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **16**: 356-358.
- Monge, R.; Chinchilla, M., 1996. Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables. *Journal of Food Protection*, **59**: 202-203.
- Monge-Maillo, B.; Jiménez, B.C.; Pérez-Molina, J.A.; Norman, F.; Navarro, M.; Pérez-Ayala, A.; Herrero, J.M.; Zamarrón, P.; López-Vélez, R., 2009. Imported infectious diseases in mobile populations, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, **15**: 1745-1752.
- Monis, P.T.; Cacciò, S.M.; Thompson, R.C.A., 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology*, **25**: 93-100.
- Montemayor, M.; Valero, F.; Cofre, J.; Lucena, F., 2005. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw and treated sewage and river water in north-Spain. *Journal of Applied Microbiology*, **99**: 1455-1462.
- Moodley, D.; Jackson, T.F.; Gathiram, V.; van de Ende, J., 1991. *Cryptosporidium* infections in children in Durban, seasonal variation, age distribution and disease status. *South African Medical Journal*, **79**: 295-297.
- Morgan, U.; Weber, R.; Xiao, L.; Sulaiman, I.; Thompson, R.C.A.; Ndiritu, W.; Lal, A.; Moore, A.; Deplazes, P., 2000. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**: 1180-1183.
- Morita, S.; Namikoshi, A.; Hirata, T.; Oguma, K.; Katayama, H.; Ohgaki, S.; Motoyama, N.; Fujiwara, M., 2002. Efficacy of UV irradiation inactivating of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 5387-5393.
- Morrison, H.G.; Svärd, S., 2011. Genomics of *Giardia*. En: *Giardia* a model organism. Luján, H.D.; Svärd, S. (Eds.), SpringerWienNewYork, pp: 95-101.
- Morse, T.D.; Nichols, R.A.B.; Grimason, A.M.; Campbell, B.M.; Tembo, K.C.; Smith, H.V., 2007. Incidence of cryptosporidiosis species in paediatric patients in Malawi. *Epidemiology and Infection*, **135**: 1307-1315.
- Mtapuri-Zinyowera, S.; Midzi, N.; Muchaneta-Kubara, C.E.; Simbini, T.; Mduluzi, T., 2009. Impact of solar radiation in disinfecting drinking water contaminated with *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica/dispar* at a point-of-use water treatment. *Journal of Applied Microbiology*, **106**: 847-852.
- Mueller-Doblies, D.; Giles, M.; Elwin, K.; Smith, R.P.; Clifton-Hadley, F.A.; Chalmers, R.M., 2008. Distribution of *Cryptosporidium* species in sheep in the UK. *Veterinary Parasitology*, **154**: 214-219.

- Muñoz-Antoli, C.; Pavón, A.; Marcilla, A.; Toledo, R.; Esteban, J.G., 2011. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in schoolchildren from department of Rio San Juan (Nicaragua). *Tropical Biomedicine*, **28**: 40-47.
- Muthusamy, D.; Rao, S.S.; Ramani, S.; Monica, B.; Banerjee, I.; Abraham, O.C.; Mathai, D.C.; Primrose, B.; Muliyl, J.; Wanke, C.A.; Ward, H.D.; Kang, G., 2006. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**: 632-634.
- Naciri, M.; Mancassola, R.; Yvoré, P.; Peeters, J.E., 1993. The effect of halofuginone lactate on experimental *C. parvum* infections in calves. *Veterinary Parasitology*, **45**: 199-207.
- Natividad, F.F.; Buerano, C.C.; Lago, C.B.; Mapua, C.A.; de Guzman, B.B.; Seraspe, E.B.; Samentar, L.P.; Endo, T., 2008. Prevalence rates of *Giardia* and *Cryptosporidium* among diarrheic patients in Philippines. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **39**: 991-999.
- Navarro-i-Martínez, L.; Bornay-Llinares, F.J.; Rueda, C.; del Águila, C.; da Silva, A.J.; Oleaga, A.; Ramajo, V.; Fenoy, S.; Pieniazek, N.J., 2003. Molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. from animals in Spain. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50**: 553-554.
- Navarro-i-Martínez, L.; da Silva, A.J.; Bornay-Llinares, F.J.; Moura, I.N.; del Águila, C.; Oleaga, A.; Pieniazek, N.J., 2007. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* bovis-like isolate from a newborn lamb in Spain. *Journal of Parasitology*, **93**: 1536-1538.
- Navarro-i-Martínez, L.; del Águila, C.; Bornay-Llinares, F.J., 2011. *Cryptosporidium*: un género en revisión. Situación en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **29**: 135-143.
- Němejc, K.; Sak, B.; Květoňová, D.; Hanzal, V.; Jeníková, M.; Kváč, M., 2011. The first report on *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*) (Czech Republic). *Veterinary Parasitology*, **184**: 122-125.
- Newman, R.D.; Zu, S.X.; Wuhib, T.; Lima, A.A.; Guerrant, R.L.; Sears, C.L., 1994. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in an urban community in northeast Brazil. *Annals of Internal Medicine*, **120**: 500-505.
- Ng, J.; Yang, R.; McCarthy, S.; Gordon, C.; Hijjawi, N.; Ryan, U., 2011a. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pre-weaned calves in Western Australia and New South Wales. *Veterinary Parasitology*, **176**: 145-150.
- Ng, J.; Yang, R.; Whiffin, V.; Cox, P.; Ryan, U., 2011b. Identification of zoonotic *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes infecting animals in Sydney's catchments. *Experimental Parasitology*, **128**: 138-144.
- Nichols, G., 2008. Epidemiology of *Cryptosporidium*. En: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer, R.; Xiao, L. (Eds.), CRC Press, pp: 79-118.
- Nichols, G.; Lane, C.; Asgari, N.; Verlander, N.Q.; Charlett, A., 2009. Rainfall and outbreaks of drinking water related disease in England and Wales. *Journal of Water and Health*, **7**: 1-8.
- Nime, F.A.; Burek, J.D.; Page, D.L.; Holscher, M.A.; Yardley, J.H., 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, **70**: 592-598.
- Nolan, M.J.; Jex, A.R.; Pangasa, A.; Young, N.D.; Campbell, A.J.; Stevens, M.; Graser, R.B., 2010. Analysis of nucleotide variation within the triose-phosphate isomerase gene of *Giardia duodenalis* from sheep and its zoonotic implications. *Electrophoresis*, **31**: 287-298.

- Nydam, D.V.; Susan, D.V.M.; Wade, E.; Schaaf, S.L.; Mohammed, H.O., 2001. Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp. cysts shed by dairy calves after natural infection. *American Journal of Veterinary Research*, **62**: 1612-1615.
- Nygård, K.; Schimmer, B.; Søbstad, Ø.; Walde, A.; Tveit, I.; Langeland, N.; Hausken, T.; Aavitsland, P., 2006. A large community outbreak of waterborne giardiasis-delayed detection in a non-endemic urban area. *BioMed Central Public Health*, **6**: 141.
- O'Donogue, P.J., 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, **25**: 139-195.
- O'Handley, R.M.; Olson, M.E., 2006. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **22**: 623-643.
- O'Handley, R.M.; Olson, M.E.; McAllister, T.A.; Morck, D.W.; Jelinski, M.; Royan, G.; Cheng, K.J., 1997. Efficacy of fenbendazole for treatment of giardiasis in calves. *American Journal of Veterinary Research*, **58**: 384-388.
- O'Handley, R.M.; Cockwill, C.; McAllister, T.A.; Jelinski, M.; Morck, D.W.; Olson, M.E., 1999. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **214**: 391-396.
- O'Handley, R.M.; Cockwill, C.; McAllister, T.A.; Jelinski, M.; Morck, D.W.; Olson, M.E., 2000. Effects of repeat fenbendazole treatment in dairy calves with giardiasis on cyst excretion, clinical signs and production. *Veterinary Parasitology*, **89**: 209-218.
- Okhuysen, P.C.; Chappell, C.L.; Crabb, J.H.; Sterling, C.R.; DuPont, H.L., 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *Journal of Infectious Diseases*, **180**: 1275-1281.
- Olson, M.E.; Thorlakson, C.L.; Deselliers, L.; Morck, D.W.; McAllister, T.A., 1997. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Veterinary Parasitology*, **68**: 375-381.
- Olson, M.E.; Goh, J.; Phillips, M.; Guselle, N.; McAllister, T.A., 1999. *Giardia* cyst and *Cryptosporidium* oocyst survival in water, soil and cattle feces. *Journal of Environmental Quality*, **28**: 1991-1996.
- Ong, C.; Moorehead, W.; Ross, A.; Isaac-Renton, J., 1996. Studies of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in two adjacent watersheds. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 2798-2805.
- Ono, K.; Tsuji, H.; Rai, S.K.; Yamamoto, A.; Masuda, K.; Endo, T.; Hotta, H.; Kawamura, T.; Uga, S., 2001. Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in western Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 3832-3836.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 1997. The World Health report-fighting disease, fostering development. *World Health Forum*, **18**: 1-8.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2002. Guidelines for drinking water quality. Addendum microbial agents in drinking water. World Health Organization (Ed.), WHO Press, ISBN: 92-4-154535-6, 142 pp.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2006a. Guidelines for the safe use of wastewater excreta and greywater. [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/wastewater/qsuweg2/en/index.html](http://www.who.int/water_sanitation_health/wastewater/qsuweg2/en/index.html).
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2006b. Guidelines for safe recreational waters. Volume 2: swimming pools and similar recreational-water environments. [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/bathing/bathing2/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/bathing2/en/).
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2009a. Risk assessment of *Cryptosporidium* in drinking-water. World Health Organization (Ed.), WHO Press, 134 pp.

- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2009b. Addendum to the who guidelines for safe recreacional water environments. Volume 1: coastal and fresh waters. List of agreed updates. [http://whqlibdoc.who.int/hq/2010/WHO\\_HSE\\_WSH\\_10.04\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2010/WHO_HSE_WSH_10.04_eng.pdf).
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2011a. Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization (Ed.), WHO Press, ISBN: 9789241548151, 668 pp.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2011b. Revisión anual mundial de saneamiento y agua potable (GLAAS) de ONU-AGUA de 2010: focalizando los recursos para los mejores resultados. World Health Organization (Ed.), WHO Press, ISBN: 9789243599359, 90 pp.
- Ortega, Y.R.; Roxas, C.R.; Gilman, R.H.; Miller, N.J.; Cabrera, L.; Taquiri, C.; Sterling, C.R., 1997. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **57**: 683-686.
- Ortega-Mora, L.M.; Wright, S.E., 1994. Age-related resistance in ovine cryptosporidiosis: patterns of infection and humoral immune response. *Infection and Immunity*, **62**: 5003-5009.
- Ortega-Mora, L.M.; Gómez-Bautista, M.; Rojo-Vázquez, F.A., 1999a. Parasitosis de los rumiantes: cryptosporidiosis. En: Parasitología veterinaria. Cordero del Campillo, M.; Rojo-Vázquez, F.A. (Eds.), McGraw-Hill Interamericana, ISBN: 978848602369, pp. 213-221.
- Ortega-Mora, L.M.; Requejo-Fernández, J.A.; Pilar-Izquierdo, M.; Pereira-Bueno, J., 1999b. Role of adult sheep in transmission of infection by *Cryptosporidium parvum* to lambs: confirmation of periparturient rise. *International Journal for Parasitology*, **29**: 1261-1268.
- Pagés-Manté, A.; Pagés-Bosch, M.; Majó-Masferrer, N.; Gómez-Couso, H.; Ares-Mazás, E., 2007. An outbreak of disease associated with cryptosporidia on a red-legged partridge (*Alectoris rufa*) game farm. *Avian Pathology*, **36**: 275-278.
- Palmer, C.S.; Traub, R.J.; Robertson, I.D.; Devlin, G.; Rees, R.; Thompson, R.C.A., 2008. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, **154**: 142-147.
- Panciera, R.J.; Thomassen, R.W.; Garner, F.M., 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology*, **8**: 479-484.
- Pankratz, T.M., 1998. Screening equipment handbook: for industrial and municipal water and wastewater treatment. Lancaster, PA (Ed.), Technomic Publishing Company, ISBN: 1566762561, 282 pp.
- Paraud, C.; Chartier, C., 2012. Cryptosporidiosis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, **103**: 93-97.
- Park, J.H.; Guk, S.M.; Han, E.T.; Shin, E.H.; Kim, J.L.; Chai, J.Y., 2006. Genotype analysis of *Cryptosporidium* spp. prevalent in a rural village in Hwasun-gun, Republic of Korea. *Korean Journal of Parasitology*, **44**: 27-33.
- Pavlásek, I.; Nágl, I.; Vácha, J.; Lávicová, M., 1993. The first finding of *Giardia* in roebucks (*Capreolus capreolus* L.). *Veterinary Medicine*, **38**: 381-384.
- Payment, P.; Plante, R.; Cejka, P., 2001. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. *Canadian Journal of Microbiology*, **47**: 188-193.



- Paziewska, A.; Bednarska, M.; Nieweglowski, H.; Karbowiak, G.; Bajer, A., 2007. Distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in selected species of protected and game mammals from North-Eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **14**: 265-270.
- Pedraza-Díaz, S.; Amar, C.; Iversen, A.M.; Stanley, P.J.; McLauchlin, J., 2001a. Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* "dog type" from patients in England. *Journal of Medical Microbiology*, **50**: 293-296.
- Pedraza-Díaz, S.; Amar, C.F.L.; McLauchlin, J.; Nichols, G.L.; Cotton, K.M.; Godwin, P.; Iversen, A.M.; Milne, L.; Mulla, J.R.; Nye, K.; Panigrahl, H.; Venn, S.R.; Wiggins, R.; Williams, M.; Youngs, E.R., 2001b. *Cryptosporidium meleagridis* from humans: molecular analysis and description of affected patients. *Journal of Infection*, **42**: 243-250.
- Pedraza-Dueñas, A.; Ripoll-Lozano, M.A.; Sahagún-Salcedo, B., 1994. Infestación por *Giardia lamblia* en la población infantil de la zona básica de salud de Ávila rural este. *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, **68**: 399-404.
- Peeters, J.E.; Ares-Mazás, E.; Masschelein, W.J.; Villacorta-Martínez de Maturana, I.; Debacker, E., 1989. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**: 1519-1522.
- Peng, M.M.; Xiao, L.; Freeman, A.R.; Arrowood, M.J.; Escalante, A.A.; Weltman, A.C.; Ong, C.S.; Mac Kenzie, W.R.; Lal, A.A.; Beard, C.B., 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging Infectious Diseases*, **3**: 567-573.
- Pereira, J.T.; Costa, A.O.; de Oliveira Silva, M.B.; Schuchard, W.; Osaki, S.C.; de Castro, E.A.; Paulino, R.C.; Soccol, V.T., 2008. Comparing the efficacy chlorine, chlorine dioxide and ozone in the inactivation of *Cryptosporidium parvum* in water from Parana State, Southern Brazil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **151**: 464-473.
- Pérez-Cordón, G.; Cordova-Paz-Soldan, O.; Vargas-Vázquez, F.; Velasco-Soto, J.R.; Sempere-Bordes, L.I.; Sánchez-Moreno, M.; Rosales, M.J., 2008. Prevalence of enteroparasites and genotyping of *Giardia lamblia* in Peruvian children. *Parasitology Research*, **103**: 459-465.
- Perz, J.F.; Le Blancq, S.M., 2001. *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York State. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 1154-1162.
- Petri, W.A., 2005. Treatment of giardiasis. *Current Treatment Options in Gastroenterology*, **8**: 13-17.
- Petry, F., 2004. Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Microscopy and Microanalysis*, **10**: 586-601.
- Pilar-Izquierdo, M.; Ortega-Mora, L.M.; Pereira-Bueno, J.; Rojo-Vázquez, F.A., 1993. Participación de *Cryptosporidium parvum* en brotes de diarrea en corderos en el NO de Castilla y León. III Congreso Ibérico de Parasitología. Lisboa, Portugal, *Acta Parasitologica Portuguesa*, **1**: 223.
- Pinna, W.; Nieddu, G.; Moniello, G.; Cappai, M.G., 2007. Vegetable and animal food sorts found in the gastric content of Sardinian wild boar (*Sus scrofa meridionalis*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **91**: 252-255.
- Pintar, K.D.; Fazil, A.; Pollari, F.; Charron, D.F.; Waltner-Toews, D.; McEwen, S.A., 2010. A risk assessment model to evaluate the role of fecal contamination in recreational water on the incidence of cryptosporidiosis at the community level in Ontario. *Risk Analysis*, **30**: 49-64.



- Plutzer, J.; Karanis, P., 2007. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Veterinary Parasitology*, **146**: 357-362.
- Plutzer, J.; Karanis, P., 2009. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. *Veterinary Parasitology*, **165**: 187-199.
- Plutzer, J.; Tomor, B., 2009. The role of aquatic birds in the environmental dissemination of human pathogenic *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Hungary. *Parasitology International*, **58**: 227-231.
- Plutzer, J.; Ongerth, J.; Karanis, P., 2010. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **213**: 321-333.
- Pohlenz, J.; Bemrick, W.J.; Moon, H.V.; Cheville, N.F., 1978. Bovine cryptosporidiosis: a transmission and scanning electron microscopic study of some stages in the life cycle and of the host parasite relationship. *Veterinary Pathology*, **15**: 417-427.
- Pollock, K.G.J.; Young, D.; Smith, H.V.; Ramsay, C.N., 2008. Cryptosporidiosis and filtration of water from Loch Lomond, Scotland. *Emerging Infectious Diseases*, **14**: 115-120.
- Portús, M.; Prats, G., 1981. Contribución al conocimiento de las protozoosis intestinales en la población hospitalaria barcelonesa. *Medicina Clínica*, **76**: 203-205.
- Portús, M.; Serra, T.; Botet, J.; Gállego, J., 1985. Cryptosporidiosis humana en España. *Medicina Clínica*, **84**: 462.
- Power, M.; Ryan, U.M., 2008. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *Journal of Parasitology*, **94**: 1114-1117.
- Pritchard, G.C.; Marshall, J.A.; Giles, M.; Chalmers, R.M.; Marshall, R.N., 2007. *Cryptosporidium parvum* infection in orphan lambs on a farm open to the public. *Veterinary Record*, **161**: 11-14.
- Putignani, L.; Tait, A.; Smith, H.V.; Horner, D.; Tovar, J.; Tetley, L.; Wastling, J.M., 2004. Characterization of a mitochondrion-like organelle in *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*, **129**: 1-18.
- Quílez, J.; Sánchez-Acedo, C.; del Cacho, E.; Clavel, A.; Causapé, A.C., 1996. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, **66**: 139-146.
- Quílez, J.; Torres, E.; Chalmers, R.M.; Hadfield, S.J.; del Cacho, E.; Sánchez-Acedo, C., 2008a. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**: 6026-6031.
- Quílez, J.; Torres, E.; Chalmers, R.M.; Robinson, G.; del Cacho, E.; Sánchez-Acedo, C., 2008b. *Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain. *Parasitology*, **135**: 1613-1620.
- Quílez Cinca, J., 1994. Contribución al conocimiento de la epidemiología de la cryptosporidiosis bovina y porcina en Aragón. Valoración de diversas técnicas diagnósticas. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, 355 pp.
- Quílez-Cinca, J.; Sánchez-Acedo, C.; Clavel-Parrilla, A.; Causapé-Valenzuela, A.C., 1992. Prevalencia de parasitación por *Cryptosporidium parvum* en terneros lactantes. IX Reunión Científica de la Asociación de Parasitólogos Españoles. León, España, *Libro de Comunicaciones*, p. 26.

- Quintero-Betancourt, W.; Gennacaro, A.L.; Scott, T.M.; Rose, J.B., 2003. Assessment of methods for detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in reclaimed effluents. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 5380-5388.
- Ralston, B.J.; McAllister, T.A.; Olson, M.E., 2003. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. *Veterinary Parasitology*, **114**: 113-122.
- Ramahlo, R.S., 1996. Tratamiento de aguas residuales. Reverté (Ed.), ISBN: 9788429179750, pp: 1-26.
- Ranjbar-Bahadori, S.; Sangsefidi, H.; Shemshadi, B.; Kashefinejad, M., 2011. Cryptosporidiosis and its potential risk factors in children and calves in Babol, north of Iran. *Tropical Biomedicine*, **28**: 125-131.
- Read, C.; Walters, J.; Robertson, I.D.; Thompson, R.C.A., 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *International Journal for Parasitology*, **32**: 229-231.
- Read, C.M.; Monis, P.T.; Thompson, R.C.A., 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, **4**: 125-130.
- Redder, A.; Dürr, M.; Daeschlein, G.; Baeder-Bederski, O.; Koch, C.; Müller, R.; Exner, M.; Borneff-Lipp, M., 2010. Constructed wetlands - Are they safe in reducing protozoan parasites?. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **213**: 72-77.
- Reed, A.D.; Meyer, J.L.; Aljibury, F.K., 1976. Irrigation costs. Agricultural Extension Service, California University.
- Reinoso, R.; Torres, L.A.; Bécares, E., 2008. Efficiency of natural systems for removal bacteria and pathogenic parasites from wastewater. *Science of the Total Environment*, **395**: 80-86.
- Reinthal, F.F.; Linck, G.; Klem, G.; Mascher, F.; Sixl, W., 1988. Intestinal parasites in children with diarrhea in El Salvador. *Geographia Medica*, **18**: 175-180.
- Ren, X.; Zhao, J.; Zhang, L.; Ning, C.; Jian, F.; Wang, R.; Lv, C.; Wang, Q.; Arrowood, M.J.; Xiao, L., 2012. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology*, **130**: 274-281.
- Requejo-Fernández, J.A.; Pereira-Bueno, J.; Pilar-Izquierdo, M.; Rojo-Vázquez, F.A.; Ortega-Mora, L.M., 1995. Papel epidemiológico de los animales adultos en la infección por *Cryptosporidium parvum* en la especie ovina: eliminación de ooquistes en el periparto. IV Congreso Ibérico de Parasitología. Santiago de Compostela, España, *Libro de Comunicaciones*, pp. 122-123.
- Reynolds, K.A.; Mena, K.D.; Gerba, C.P., 2008. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Reviews of Environmental Contaminations and Toxicology*, **192**: 117-158.
- Richardson, S.D.; Plewa, M.J.; Wagner, E.D.; Schoeny, R.; DeMarini, D.M., 2007. Occurrence, genotoxicity and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and a roadmap for research. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **636**: 178-242.
- Rickard, L.G.; Siefker, C.; Boyle, C.R.; Gentz, E.J., 1999. The prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in fecal samples from free ranging white tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in the southeastern United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **11**: 65-72.
- Risebro, H.L.; Doria, M.F.; Andersson, Y.; Medema, G.; Osborn, K.; Schlooser, O.; Hunter, P.R., 2007. Fault tree analysis of the causes of waterborne outbreaks. *Journal of Water and Health*, **5**: 1-18.
- Roach, P.D.; Olson, M.E.; Whitley, G.; Wallis, P.M., 1993. Waterborne *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in the Yukon, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 67-73.

- Robertson, L.J., 2009. *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: a review of the potential for transmission to humans via environmental contamination. *Epidemiology and Infection*, **137**: 913-921.
- Robertson, L.J.; Gjerde, B.K., 2001a. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw waters in Norway. *Scandinavian Journal of Public Health*, **29**: 200-207.
- Robertson, L.J.; Gjerde, B.K., 2001b. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *Journal of Food Protection*, **64**: 1793-1798.
- Robertson, L.J.; Gjerde, B.K., 2004. Effects of the Norwegian winter environment on *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Microbial Ecology*, **47**: 359-365.
- Robertson, L.J.; Gjerde, B.K., 2007. *Cryptosporidium* oocysts: challenging adversaries?. *Trends in Parasitology*, **23**: 344-347.
- Robertson, L.J.; Campbell, A.T.; Smith, H.V., 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 3494-3500.
- Robertson, L.J.; Paton, C.A.; Campbell, A.T.; Smith, P.G.; Jackson, M.H.; Gilmour, R.A.; Black, S.E.; Stevenson, D.A.; Smith, H.V., 2000. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. *Water Research*, **34**: 2310-2322.
- Robertson, L.J.; Johannessen, G.S.; Gjerde, B.K.; Loncarevic, S., 2002. Microbial analysis of seed sprouts in Norway. *International Journal of Food Microbiology*, **75**: 119-126.
- Robertson, L.J.; Forberg, T.; Hermansen, L.; Gjerde, B.K.; Alvsvåg, J.O.; Langeland, N., 2006a. *Cryptosporidium parvum* infections in Bergen, Norway, during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in autumn and winter 2004. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 2218-2220.
- Robertson, L.J.; Hermansen, L.; Gjerde, B.K., 2006b. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 5297-5303.
- Robertson, L.J.; Hermansen, L.; Gjerde, B.K.; Strand, E.; Alvsvåg, J.O.; Langeland, N., 2006c. Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 2212-2217.
- Robertson, L.J.; Forberg, T.; Hermansen, L.; Hamnes, I.S.; Gjerde, B., 2007. *Giardia duodenalis* cysts isolated from wild moose and reindeer in Norway: genetic characterization by PCR-RFLP and sequence analysis at two genes. *Journal of Wild Diseases*, **43**: 576-585.
- Robertson, L.J.; Gjerde, B.K.; Furuseth-Hansen, E., 2010. The zoonotic potential of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian sheep: a longitudinal investigation of 6 flocks of lambs. *Veterinary Parasitology*, **171**: 140-145.
- Robinson, R.A.; Sutherland, W.J., 2002. Post-war changes in arable farming and biodiversity in Great Britain. *Journal of Applied Ecology*, **39**: 157-176.
- Robinson, G.; Elwin, K.; Chalmers, R.M., 2008. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*, **14**: 1567-1574.
- Robinson, G.; Wright, S.; Elwin, K.; Hadfield, S.J.; Katzer, F.; Bartley, P.M.; Hunter, P.R.; Nath, M.; Innes, E.A.; Chalmers, R.M., 2010. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *International Journal for Parasitology*, **40**: 1539-1548.

- Robinson, G.; Chalmers, R.M.; Stapleton, C.; Palmer, S.R.; Watkins, J.; Francis, C.; Kay, D., 2011. A whole water catchment approach to investigating the origin and distribution of *Cryptosporidium* species. *Journal of Applied Microbiology*, **111**: 717-730.
- Rochelle, P.A.; Mofidi, A.A.; Marshall, M.M.; Upton, S.J.; Montelone, B.; Woods, K.; Di Giovanni, G., 2004. An investigation of UV disinfection and repair in *Cryptosporidium parvum*. American Water Works Association Research Foundation (Eds.), IWA Publishing, ISBN: 9781843399087, 104 pp.
- Rodríguez-Hernández, J.; Canut-Blasco, A.; Martín-Sánchez, A.M., 1996. Seasonal prevalences of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in children attending day care centres in Salamanca (Spain) studied for a period of 15 months. *European Journal of Epidemiology*, **12**: 291-295.
- Rodríguez-Salinas Pérez, E.; Aragón Peña, A.J.; Allue Tango, M.; Lópaz Pérez, M.A.; Jiménez Maldonado, M.; Domínguez Rodríguez, M.J., 2000. Brote de cryptosporidiosis en Guadarrama (Comunidad Autónoma de Madrid). *Revista Española de Salud Pública*, **74**: 527-536.
- Rojo-Vázquez, F.A.; Gass, A.; Alunda, J.M., 1985. Denuncia en España de la cryptosporidiosis ovina. IV Congreso Nacional de Parasitología. Tenerife, España, *Libro de Comunicaciones*, p. 166.
- Rose, J.B., 1997. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Annual Review of Public Health*, **18**: 135-161.
- Rose, J.B., 2007. Water reclamation, reuse and public health. *Water Science and Technology*, **55**: 275-282.
- Ruecker, N.J.; Braithwaite, S.L.; Topp, E.; Edge, T.; Lapen, D.R.; Wilkes, G.; Robertson, W.; Medeiros, D.; Sensen, C.W.; Neuman, N.F., 2007. Tracking host sources of *Cryptosporidium* spp. in raw water for improved health risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 3945-3957.
- Ruest, N.; Faubert, G.M.; Couture, Y., 1998. Prevalence and geographical distribution of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in dairy farm in Quebec. *Canadian Journal of Veterinary*, **39**: 697-700.
- Ryan, U.; Xiao, L.; Read, C.; Zhou, L.; Lal, A.A.; Pavlasek, I., 2003. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 4302-4307.
- Ryan, U.M.; Bath, C.; Robertson, I.; Read, C.; Elliot, A.; McInnes, L.; Traub, R.; Besier, B., 2005. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 4992-4997.
- Ryan, U.M.; Power, M.; Xiao, L., 2008. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **55**: 22-26.
- Sagebiel, D.; Weitzel, T.; Stark, K.; Leitmeyer, K., 2009. Giardiasis in kindergartens: prevalence study in Berlin, Germany, 2006. *Parasitology Research*, **105**: 681-687.
- Sahagún, J.; Clavel, A.; Goñi, P.; Seral, C.; Llorente, M.T.; Castillo, F.J.; Capilla, S.; Arias, A.; Gómez-Lus, R., 2008. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **27**: 81-83.
- Samie, A.; Bessong, P.O.; Obi, C.L.; Sevilleja, J.E.; Stroup, S.; Houpt, E.; Guerrant, R.L., 2006. *Cryptosporidium* species: preliminary descriptions of the prevalence and genotype distribution among school children and hospital patients in the Venda region, Limpopo Province, South Africa. *Experimental Parasitology*, **114**: 314-322.
- Sánchez-Acedo, C.; Fleta-Zaragozano, J.; Clavel-Parrilla, A.; Quílez-Cinca, 1991a. Identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en órganos y vísceras de diversas especies de animales.

- I Congreso Internacional de las Asociaciones Sudoccidentales-Europeas de Parasitología (ICASEP I). Valencia, España, *Libro de Comunicaciones*, p. 364.
- Sánchez-Acedo, C.; Fleeta-Zaragozano, J.; Clavel-Parrilla, A.; Quílez-Cinca, J., 1991b. *Cryptosporidium* spp. como agente productor de diarrea en ganado ovino. *VI Jornadas sobre Producción Animal*, **11**: 701-703.
- Sanford, S.A.; Josephson, G.K.A., 1982. Bovine cryptosporidiosis: clinical and pathological findings in forty-two scouring neonatal calves. *Canadian Journal of Veterinary*, **23**: 340-343.
- Santín, M.; Trout, J.M., 2008. Livestock. En: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer, R.; Xiao, L. (Eds.), CRC Press, pp. 451-484.
- Santín, M.; Trout, J.M.; Xiao, L.; Zhou, L.; Greiner, E.; Fayer, R., 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*, **122**: 103-117.
- Santín, M.; Trout, J.M.; Fayer, R., 2007. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Veterinary Parasitology*, **146**: 17-24.
- Santín, M.; Trout, J.M.; Fayer, R., 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, **155**: 15-23.
- Santín, M.; Trout, J.M.; Fayer, R., 2009. A longitudinal study of *Giardia duodenalis* genotypes in dairy cows from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, **162**: 40-45.
- Savioli, L.; Smith, H.; Thompson, A., 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the "Neglected Diseases Initiative". *Trends in Parasitology*, **22**: 203-208.
- Scott, C.A.; Smith, H.V.; Mtambo, M.M.; Gibbs, H.A., 1995. An epidemiological study of *Cryptosporidium parvum* in two herds of adult beef cattle. *Veterinary Parasitology*, **57**: 277-288.
- Searcy, K.E.; Packman, A.I.; Atwill, E.R.; Harter, T., 2005. Association of *Cryptosporidium parvum* with suspended particles: impact on oocysts sedimentation. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 1072-1078.
- Semenza, J.C.; Nichols, G., 2007. Cryptosporidiosis surveillance and water-borne outbreaks in Europe. *Euro Surveillance*, **12**: 13-14.
- Serra, T.; Botet, J.; Portús, M.; Gállego, J., 1984. La cryptosporidiosis en España. Estudio preliminar. IV Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles. Madrid, España. *Libro de Resúmenes*, p. 74.
- Serra, T.; Bras, J.; Portús, M.; Jover, L.; Font, I.; Gállego, J., 1987. Sobre la epidemiología de los protozoos intestinales en Barcelona. *Revista Ibérica de Parasitología*, **47**: S 17-24.
- Shaw, P.K.; Brodsky, R.E.; Lyman, D.O.; Wood, B.T.; Hibbler, C.P.; Healy, G.R.; Macleod, K.I.; Sthal, W.; Schultz, M.G., 1977. A communitywide outbreak of giardiasis with evidence of transmission by a municipal water supply. *Annals of Internal Medicine*, **87**: 426-432.
- Siefker, C.; Rickard, L.G.; Pharr, G.T.; Simmons, J.S.; O'Hara, T.M., 2002. Molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. isolated from northern Alaskan caribou (*Rangifer tarandus*). *Journal of Parasitology*, **88**: 213-216.
- Singh, A.; Janaki, L.; Petri, W.A. Jr.; Houpt, E.R., 2009. *Giardia intestinalis* assemblages A and B infections in Nepal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **81**: 538-539.

- Sischo, W.M.; Atwill, E.R.; Lanyon, L.E.; George, J., 2000. Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States. *Preventive Veterinary Medicine*, **43**: 253-267.
- Slapeta, J., 2012. Letter: The name *Cryptosporidium tyzzeri* Ren, Zhao, Zhang, Ning, Jian, Wang, LV, Wang, Arrowood and Xiao, 2011 is permanently invalid. *Experimental Parasitology*, **130**: 306-307.
- Slavin, D., 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*, **65**: 262-266.
- Slifko, T.R.; Smith, H.V.; Rose, J.B., 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1379-1393.
- Smith, H., 2008. Diagnostics. En: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer, R.; Xiao, L. (Eds.), CRC Press, pp. 173-208.
- Smith, H.V.; Rose, J.B.; 1990. Waterborne cryptosporidiosis. *Parasitology Today*, **6**: 8-12.
- Smith, H.V.; Grimason, A.M., 2003. *Giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater. En: The handbook of water and wastewater microbiology. Mara, D.; Horan, N. (Eds.), Academic Press, pp. 695-756.
- Smith, H.V.; Corcoran, G.D., 2004. New drugs and treatment for cryptosporidiosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **17**: 557-564.
- Smith, H.V.; Nichols, R.A.B., 2010. *Cryptosporidium*: detection in water and food. *Experimental Parasitology*, **124**: 61-79.
- Smith, H.V.; Mank, T.G., 2011. Diagnosis of human giardiasis. En: *Giardia* a model organism. Luján, H.D.; Svärd, S. (Eds.), SpringerWienNewYork, pp. 353-377.
- Smith, H.V.; Cacciò, S.M.; Cook, N.; Nichols, R.A.B.; Tait, A., 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology*, **149**: 29-40.
- Smith, A.J.; Lauwaet, T.; Davids, B.J.; Gillin, F.D., 2012. *Giardia lamblia* Nek1 and Nek2 kinases affect mitosis and excystation. *International Journal for Parasitology*, **42**: 411-419.
- Snel, S.J.; Baker, M.G.; Kamalesh, V.; French, N.; Learmonth, J., 2009. A tale of two parasites: the comparative epidemiology of cryptosporidiosis and giardiasis. *Epidemiology and Infection*, **137**: 1641-1650.
- Snodgrass, D.R.; Angus, K.W.; Gray, E.W., 1984. Experimental cryptosporidiosis in germfree lambs. *Journal of Comparative Pathology*, **94**: 141-152.
- Spano, F.; Crisanti, A., 2000. *Cryptosporidium parvum*: the secrets of the small genome. *International Journal for Parasitology*, **30**: 553-565.
- Spellman, F.R.; Drinan, J., 2000. The drinking water book. Technomic Publishing Company (Ed.), CRC Press, ISBN: 1566768330, 260 pp.
- Sprong, H.; Cacciò, S.M.; van der Giessen, J.W., 2009. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **3**: e558.
- Sterling, C.R., 1990. Waterborne cryptosporidiosis. En: *Cryptosporidiosis of man and animals*. Dubey, J.P.; Speer, C.A.; Fayer, R. (Eds.), CRC Press, pp. 51-58.
- Stiles, C.W., 1902. The type species of certain genera of parasitic flagellates, particularly Grassi's genera of 1879 and 1881. *Zoologische Anzeiger*, **25**: 689.



- Stockdale, H.D.; Spencer, J.A.; Blagburn, B.L., 2008. Prophylaxis and chemotherapy. *En: Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Fayer, R.; Xiao, L. (Eds.), CRC Press, pp. 255-287.
- Sulaiman, I.M.; Xiao, L.; Yang, C.; Escalante, L.; Moore, A.; Beard, C.B.; Arrowood, M.J.; Lal, A.A., 1998. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerging Infectious Diseases*, **4**: 681-685.
- Sulaiman, I.M.; Fayer, R.; Bern, C.; Gilman, R.H.; Trout, J.M.; Schantz, P.M.; Das, P.; Lal, A.A.; Xiao, L., 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging Infectious Diseases*, **9**: 1444-1452.
- Sunderland, D.; Graczyk, T.K.; Tamang, L.; Breyse, P.N., 2007. Impact of bathers on levels of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts in recreational beach waters. *Water Research*, **41**: 3483-3489.
- Sunnotel, O.; Lowery, C.J.; Moore, J.E.; Dooley, J.S.G.; Xiao, L.; Millar, B.C., 2006. *Cryptosporidium*. *Letters in Applied Microbiology*, **43**: 7-16.
- Sweeny, J.P.; Ryan, U.M.; Robertson, I.D.; Yang, R.; Bell, K.; Jacobson, C., 2011. Longitudinal investigation of protozoan parasites in meat lamb farms in southern Western Australia. *Preventive Veterinary Medicine*, **101**: 192-203.
- Siwila, J.; Phiri, I.G.K.; Enemark, H.L.; Nchito, M.; Olsen, A., 2011. Seasonal prevalence and incidence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* and associated diarrhoea in children attending pre-school in Kafue, Zambia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **105**: 102-108.
- Tamburrini, A.; Pozio, E., 1999. Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal for Parasitology*, **29**: 711-715.
- Taminelli, V.; Eckert, J.; Sydler, T.; Gottstein, B.; Corboz, L.; Hofmann, M., 1989. Experimental infection of calves and sheep with bovine *Giardia* isolates. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, **131**: 551-564.
- Tebbe, C.C.; Vahjen, W., 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 2657-2665.
- ten Hove, R.; Schuurman, T.; Kooistra, M.; Möller, L.; van Lieshout, L.; Verweij, J.J., 2007. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection*, **13**: 1001-1007.
- Thiriat, L.; Sidaner, F.; Schwartzbrod, J., 1998. Determination of *Giardia* cyst viability in environmental and faecal samples by immunofluorescence, fluorogenic dye staining and differential interference contrast microscopy. *Letters in Applied Microbiology*, **26**: 237-242.
- Thompson, R.C.A., 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1259-1267.
- Thompson, R.C.A., 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary Parasitology*, **126**: 15-35.
- Thompson, R.C.A., 2008. Giardiasis: conceptos modernos sobre su control y tratamiento. *Annales Nestlé*, **66**: 23-29.
- Thompson, R.C.A.; Monis, P.T., 2004. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Advances in Parasitology*, **58**: 69-137.

- Thompson, R.C.A.; Smith, A., 2011. Zoonotic enteric protozoa. *Veterinary Parasitology*, **182**: 70-78.
- Thompson, R.C.A.; Olson, M.E.; Zhu, G.; Enomoto, S.; Abrahamsen, M.S.; Hijjawi, N.S., 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, **59**: 77-158.
- Thompson, H.P.; Dooley, J.S.; Kenny, J.; McCoy, M.; Lowery, C.J.; Moore, J.E.; Xiao, L., 2007. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitology Research*, **100**: 619-624.
- Thompson, R.C.A.; Palmer, C.S.; O'Handley, R., 2008. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animal. *Veterinary Journal*, **177**: 18-25.
- Tiangtip, R.; Jongwutiwes, S., 2002. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Tropical Medicine and International Health*, **7**: 357-364.
- Traub, R.J.; Inpankaew, T.; Reid, S.A.; Sutthikornchai, C.; Sukthana, Y.; Robertson, I.D.; Thompson, R.C.A., 2009. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in temple communities in Bangkok- a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic test in the field in the absence of a gold standard. *Acta Tropica*, **111**: 125-132.
- Trout, J.M.; Walsh, E.J.; Fayer, R., 2002. Rotifers ingest *Giardia* cysts. *Journal of Parasitology*, **88**: 1038-1040.
- Trout, J.M.; Santín, M.; Fayer, R., 2003. Identification of Assamblage A *Giardia* in white-tailed deer. *Journal for Parasitology*, **89**: 1254-1255.
- Trout, J.M.; Santín, M.; Greiner, E.; Fayer, R., 2004. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. *Veterinary Parasitology*, **124**: 179-186.
- Trout, J.M.; Santín, M.; Greiner, E.; Fayer, R., 2005. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in post-weaned dairy calves. *Veterinary Parasitology*, **130**: 177-183.
- Trout, J.M.; Santín, M.; Greiner, E.C.; Fayer, R., 2006. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in 1-2 year old dairy cattle. *Veterinary Parasitology*, **140**: 217-222.
- Trout, J.M.; Santín, M.; Fayer, R., 2007. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in adult dairy cows. *Veterinary Parasitology*, **147**: 205-209.
- Tumwine, J.K.; Kekitiinwa, A.; Bakeera-Kitaka, S.; Ndeezi, G.; Downing, R.; Feng, X.; Akiyoshi, D.E.; Tzipori, S., 2005. Cryptosporidiosis and microsporidiosis in ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**: 921-925.
- Tyzzer, E.E., 1910. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *Journal of Medical Research*, **23**: 487-509.
- Tyzzer, E.E., 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde*, **26**: 394-412.
- Tzipori, S.; Widmer, G., 2000. The biology of *Cryptosporidium*. En: Cryptosporidiosis and microsporidiosis. Petry, F. (Ed.), Karger, pp. 1-32.
- Tzipori, S.; Angus, K.W.; Campbell, I.; Gray, E.W., 1980a. *Cryptosporidium*: evidence for a single-species genus. *Infection and Immunity*, **30**: 884-886.
- Tzipori, S.; Campbell, I.; Sherwood, D.; Snodgrass, D.R.; Whitelaw, A., 1980b. An outbreak of calf diarrhoea attributed to cryptosporidial infection. *Veterinary Record*, **107**: 579-580.

- Tzipori, S.; Angus, K.W.; Campbell, I.; Gray, E.W., 1981. Diarrhea due to *Cryptosporidium* infection in artificially reared lambs. *Journal of Clinical Microbiology*, **14**: 100-105.
- Tzipori, S.; Smith, M.; Halpin, C.; Angus, K.W.; Sherwood, D.; Campbell, I., 1983. Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. *Veterinary Record*, **112**: 116-120.
- Upcroft, J.A.; McDonell, P.A.; Upcroft, P., 1998. Virulent avian *Giardia duodenalis* pathogenic for mice. *Parasitology Today*, **14**: 281-284.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), 2001. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. EPA 821-R-01-025. Office of Ground Water and Drinking Water Technical Support Center. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), 2004. Guidelines for water reuse. <http://www.epa.gov/nrmrl/pubs/625r04108/625r0418.htm>.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), 2005. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/IFA. <http://www.epa.gov/microbes/>.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), 2006. Ultraviolet disinfection guidance manual for the final long term 2 enhanced surface water treatment rule. <http://www.epa.gov/safewater/disinfection>.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), 2007. Report of the experts scientific workshop on critical research needs for the development of new or revised recreational water quality criteria. [http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/health/recreation/upload/2007\\_06\\_26\\_criteria\\_recreation\\_experts\\_expertsWorkshop](http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/health/recreation/upload/2007_06_26_criteria_recreation_experts_expertsWorkshop).
- Valladares, B.; López-Román, R.; de Armas, F.; Gijón, H., 1983. Estudio epidemiológico del parasitismo intestinal humano en el Archipiélago Canario. *Laboratorio*, **74**: 53-76.
- van der Giessen, J.W.B.; de Vries, A.; Roos, M.; Wielinga, P.; Kortbeek, L.M.; Mank, T.G., 2006. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: a phylogenetic analysis of human and animal isolates. *International Journal for Parasitology*, **36**: 849-858.
- van Keulen, H.; Feely, D.E.; Macechko, P.T.; Jarroll, E.L.; Erlandsen, S.L., 1998. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. *Journal of Parasitology*, **84**: 294-300.
- van Keulen, H.; Macechko, P.T.; Wade, S.; Schaaf, S.; Wallis, P.M.; Erlandsen, S.L., 2002. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Veterinary Parasitology*, **108**: 97-107.
- van Zeeland, Y.R.; Schoemaker, N.J.; Kik, M.J.L.; van der Giessen, J.W.B., 2008. Upper respiratory tract infection caused by *Cryptosporidium baileyi* in three mixed-bred falcons (*Falco rusticolus* x *Falco cherrug*). *Avian Diseases*, **52**: 357-363.
- Vasallo Matilla, F.; Jimeno Ortiz, A., 1985. Estudio enteroparasitológico en diversos colectivos humanos extremeños. *Laboratorio*, **79**: 299-313.
- Vasallo Matilla, F.; Vos Sans, R.; Rivera Guerrero, M.A., 1982. Nuevas aportaciones al conocimiento de las parasitosis humanas en el medio rural español. *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, **56**: 285-298.
- Viessman, W.; Hammer, M.J., 1998. Water supply and pollution control. Addison-Weslwy (Ed.), ISBN: 9780321014603, 828 pp.

- Villacorta, I.; Ares-Mazás, E.; Gutiérrez, M.E.; Pérez del Molino, M.L., 1989. Presencia de *Cryptosporidium* sp. en bovinos de Galicia (España). *Revista Ibérica de Parasitología*, **49**: 1.
- Villacorta, I.; Ares-Mazás, E.; Lorenzo, M.J., 1991a. *Cryptosporidium parvum* in cattle, sheep and pigs in Galicia (N.W. Spain). *Veterinary Parasitology*, **38**: 249-252.
- Villacorta, I.; Peeters, J.E.; Vanopdenbosch, E.; Ares-Mazás, E.; Theys, H., 1991b. Efficacy of halofuginone lactate against *Cryptosporidium parvum* in calves. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **35**: 283-287.
- Villacorta Martínez de Maturana, M.I., 1989. Diagnóstico, incidencia y profilaxis de la cryptosporidiosis. Infecciones experimentales. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, 119 pp.
- Villacorta-Martínez de Maturana, I.; Ares-Mazás, M.E.; Durán-Oreiro, D.; Lorenzo-Lorenzo, M.J., 1992. Efficacy of activated sludge in removing *Cryptosporidium parvum* oocysts from sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 3514-3516.
- Viu, M.; Quílez, J.; Sánchez-Acedo, C.; del Cacho, E.; López-Bernad, F., 2000. Field trial on the therapeutic efficacy of paromomycin on natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs. *Veterinary Parasitology*, **90**: 163-170.
- Wade, S.E.; Mohammed, H.O.; Schaaf, S.L., 2000. Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*) in 109 dairy herds in five countries of southeastern New York. *Veterinary Parasitology*, **93**: 1-11.
- Waldron, L.S.; Cheung-Kwok-Sang, C.; Power, M.L., 2010. Wildlife-associated *Cryptosporidium fayeri* in human, Australia. *Emerging Infectious Diseases*, **16**: 2006-2007.
- Wang, Y.; Feng, Y.; Cui, B.; Jian, F.; Ning, C.; Wang, R.; Zhang, L.; Xiao, L., 2010. Cervine genotype is the major *Cryptosporidium* genotype in sheep in China. *Parasitology Research*, **106**: 341-347.
- Westcott, D.W.; Ayers, R.S., 1984. Irrigation water quality criteria. En: Irrigation with reclaimed municipal wastewater: A guidance manual. Pettygrove, G.S.; Asano, T. (Eds.), Lewis Publishers Inc., pp. 331-337.
- Wiandt, S.; Grimason, A.M.; Baleux, B.; Bontoux, J., 2000. Efficiency of wastewater treatment plants at removing *Giardia* sp. cysts in southern France. *Schriftenreihe des Vereins für Wasser- Boden- und Lufthygiene*, **105**: 35-42.
- Wielinga, C.M.; Thompson, R.C.A., 2007. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology*, **134**: 1795-1821.
- Wielinga, C.; Ryan, U.; Thompson, R.C.A.; Monis, P., 2011. Multi-locus analysis of *Giardia duodenalis* intra-Assemblage B substitution patterns in cloned culture isolates suggests sub-Assemblage B analyses will require multi-locus genotyping with conserved and variable genes. *International Journal for Parasitology*, **41**: 495-503.
- Wilson, J.M.; Hankenson, F.C., 2010. Evaluation of an inhouse rapid ELISA test for detection of *Giardia* in domestic sheep (*Ovis aries*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, **49**: 809-813.
- Wilson, B.R.; Roessler, P.F.; VanDellen, E.; Abbaszadegan, M.; Gerba, C.P., 1992. Coliphage MS2 as a UV water disinfection efficacy test surrogate for bacterial and viral pathogens. *Proceedings of the American Water Works Association Water Quality Technology Conference*, Toronto, Canada.
- Xiao, L., 1994. *Giardia* infection in farm animals. *Parasitology Today*, **10**: 436-438.

- Xiao, L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, **124**: 80-89.
- Xiao, L.; Herd, R.P., 1994. Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Veterinary Parasitology*, **55**: 257-262.
- Xiao, L.; Ryan, U.M., 2004. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **17**: 483-490.
- Xiao, L.; Fayer, R., 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, **38**: 1239-1255.
- Xiao, L.; Feng, Y., 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **3**: 309-323.
- Xiao, L.; Ryan, U.M., 2008. Molecular epidemiology. En: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Fayer, R.; Xiao, L. (Eds.), CRC Press, pp. 119-172.
- Xiao, L.; Herd, R.P.; Rings, D.M., 1993. Concurrent infections of *Giardia* and *Cryptosporidium* on two Ohio farms with calf diarrhea. *Veterinary Parasitology*, **51**: 41-48.
- Xiao, L.; Herd, R.P.; McClure, K.E., 1994. Periparturient rise in the excretion of *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts as a source of infection for lambs. *Journal of Parasitology*, **80**: 55-59.
- Xiao, L.; Saeed, K.; Herd, R.P., 1996. Efficacy of albendazole and fenbendazole against *Giardia* infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, **61**: 165-170.
- Xiao, L.; Morgan, U.M.; Fayer, R.; Thompson, R.C.A.; Lal, A.A., 2000. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitology Today*, **16**: 287-292.
- Xiao, L.; Fayer, R.; Ryan, U.; Upton, S.J., 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, **17**: 72-97.
- Xiao, L.; Ryan, U.M.; Fayer, R.; Bowman, D.D.; Zhang, L., 2012. *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium pestis*: which name is valid?. *Experimental Parasitology*, **130**: 308-309.
- Xu, P.; Janex, M.L.; Savoye, P.; Cockx, A.; Lazarova, V., 2002. Wastewater disinfection by ozone: main parameters for process design. *Water Research*, **36**: 1043-1055.
- Xu, P.; Widmer, G.; Wang, Y.; Ozaki, L.S.; Alves, J.M.; Serrano, M.G.; Puiu, D.; Manque, P.; Akyoshi, D.; Mackey, A.J.; Pearson, W.R.; Dear, P.H.; Bankier, A.T.; Peterson, D.L.; Abrahamsen, M.S.; Kapur, V.; Tzipori, S.; Buck, G.A., 2004. The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature*, **431**: 1107-1112.
- Yakoob, J.; Abbas, Z.; Beg, M.A.; Naz, S.; Khan, R.; Islam, M.; Jafri, W., 2010. Prevalences of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* infection in adults presenting with chronic diarrhoea. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **104**: 505-510.
- Yang, R.; Jacobson, C.; Gordon, C.; Ryan, U., 2009. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in pre-weaned sheep in Australia. *Veterinary Parasitology*, **161**: 19-24.
- Yang, R.; Lee, J.; Ng, J.; Ryan, U., 2010. High prevalence *Giardia duodenalis* assemblage B and potentially zoonotic subtypes in sporadic human cases in Western Australia. *International Journal for Parasitology*, **40**: 293-297.
- Yason, J.A.; Rivera, W.L., 2007. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates among residents of slum area in Manila, Philippines. *Parasitology Research*, **101**: 681-687.

- Yeates, C.; Gillings, M.R.; Davison, A.D.; Altavilla, N.; Veal, D.A., 1997. PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. *Letters in Applied Microbiology*, **25**: 303-307.
- Yoder, J.S.; Beach, M.J., 2007. Cryptosporidiosis surveillance-United States, 2003-2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summary*, **56**: 1-10.
- Yoder, J.S.; Beach, M.J., 2010. *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. *Experimental Parasitology*, **124**: 31-39.
- Yoder, J.S.; Blackburn, B.G.; Craun, G.F.; Hill, V.; Levy, D.A.; Chen, N.; Lee, S.H.; Calderon, R.L.; Beach, M.J., 2004. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water- United States, 2001-2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries/CDC*, **53**: 1-22.
- Yoder, J.S.; Harral, C.; Beach, M.J., 2010. Cryptosporidiosis surveillance-United States, 2006-2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summary*, **59**: 1-14.
- Youssef, F.G.; Adib, I.; Riddle, M.S.; Schlett, C.D., 2008. A review of cryptosporidiosis in Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **38**: 9-28.
- Zaidah, A.R.; Chan, Y.Y.; Asma, H.S.; Abdullah, S.; Nurhaslindawati, A.R.; Salleh, M.; Zeehaida, M.; Lalithna, P.; Mustafa, M.; Ravichandran, M., 2008. Detection of *Cryptosporidium parvum* in HIV-infected patients in Malaysia using a molecular approach. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **39**: 511-516.
- Zali, M.R.; Mehr, A.J.; Rezaian, M.; Meamar, A.R.; Vaziri, S.; Mohraz, M., 2004. Prevalence of intestinal parasitic pathogens among HIV-positive individuals in Iran. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **57**: 268-270.
- Zardi, E.M.; Picardi, A.; Afeltra, A., 2005. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised hosts. *Chemotherapy*, **51**: 193-196.
- Zarlenga, D.S.; Trout, J.M., 2004. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. *Veterinary Parasitology*, **126**: 195-217.
- Zhang, T.; Hu, H.Y.; Zong, Z.S.; Xie, X., 2008. Removal characteristics of pathogenic protozoan in wastewater treatment and reclamation process. *China Environmental Science*, **29**: 1955-1960.
- Zhang, W.; Shen, Y.; Wang, R.; Liu, A.; Ling, H.; Li, Y.; Cao, J.; Zhang, X.; Shu, J.; Zhang, L., 2012. *Cryptosporidium cuniculus* and *Giardia duodenalis* in rabbits: genetic diversity and possible zoonotic transmission. *Plos One*, **7**: e31262.
- Zhou, L.; Fayer, R.; Trout, J.M.; Ryan, U.M.; Schaefer, F.W. III; Xiao, L., 2004a. Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 7574-7577.
- Zhou, L.; Kassa, H.; Tischler, M.L.; Xiao, L., 2004b. Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 4211-4215.
- Zhu, G.; Marchewka, M.J.; Keithly, J.S., 2000. *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology Reading*, **146**: 315-321.
- Zintl, A.; Proctor, A.F.; Read, C.; Dewaal, T.; Shanaghy, N.; Fanning, S.; Mulcahy, G., 2009. The prevalence of *Cryptosporidium* species and subtypes in human faecal samples in Ireland. *Epidemiology and Infection*, **137**: 270-277.



## APÉNDICE



## **1. ÍNDICE DE IMPACTO Y CATEGORÍAS TEMÁTICAS DE LAS PUBLICACIONES**



***Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain).**

Castro-Hermida, J.A.; [García-Presedo, I.](#); Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M.

***Science of the Total Environment*, 409: 2451-2459. 2011.**









ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>Journal Citation Reports<sup>®</sup>

2010 JCR Science Edition

## Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)Journals from: subject categories ENVIRONMENTAL SCIENCES [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)Sorted by: Impact Factor [SORT AGAIN](#)

Journals 21 - 40 (of 193)

Page 2 of 10

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data					Eigenfactor <sup>TM</sup> Metrics		
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>TM</sup> Score	Article Influence <sup>TM</sup> Score
<input type="checkbox"/>	21	<a href="#">ENVIRON MOL MUTAGEN</a>	0893-6692	2931	3.493	2.740	0.766	77	8.9	0.00510	0.743
<input type="checkbox"/>	22	<a href="#">ENVIRON POLLUT</a>	0269-7491	16668	3.395	3.860	0.624	460	5.7	0.04354	1.033
<input type="checkbox"/>	23	<a href="#">APPL CATAL A-GEN</a>	0926-860X	23192	3.384	3.637	0.547	545	6.7	0.05015	0.972
<input type="checkbox"/>	24	<a href="#">ATMOS ENVIRON</a>	1352-2310	29538	3.226	3.436	0.582	581	6.8	0.07134	1.007
<input type="checkbox"/>	25	<a href="#">GEOBIOLOGY</a>	1472-4677	739	3.207	3.435	1.061	33	3.5	0.00475	1.520
<input checked="" type="checkbox"/>	26	<a href="#">SCI TOTAL ENVIRON</a>	0048-9697	22018	3.190	3.366	0.418	697	6.5	0.05537	0.963
<input type="checkbox"/>	27	<a href="#">INT J ENVIRON SCI TE</a>	1735-1472	808	3.157		0.700	80	2.6	0.00127	
<input type="checkbox"/>	28	<a href="#">CHEMOSPHERE</a>	0045-6535	32165	3.155	3.559	0.383	768	5.6	0.08258	0.888
<input type="checkbox"/>	29	<a href="#">INT J LIFE CYCLE ASS</a>	0948-3349	1536	3.148	3.233	0.337	92	4.8	0.00452	0.809
<input type="checkbox"/>	30	<a href="#">J EXPO SCI ENV EPID</a>	1559-0631	1992	3.132	2.978	0.803	61	6.1	0.00682	1.123
<input type="checkbox"/>	31	<a href="#">ENV MICROBIOL REP</a>	1758-2229	252	3.076	3.091	0.480	98	1.4	0.00145	1.132
<input type="checkbox"/>	32	<a href="#">ECOTOXICOLOGY</a>	0963-9292	2015	3.051	2.879	0.437	158	4.7	0.00616	0.784
<input type="checkbox"/>	33	<a href="#">ENVIRON RES LETT</a>	1748-9326	888	3.049	3.413	0.699	83	2.4	0.00812	1.730
<input type="checkbox"/>	34	<a href="#">ENVIRON TOXICOL CHEM</a>	0730-7268	13592	3.026	2.840	0.361	341	7.8	0.02744	0.815
<input type="checkbox"/>	35	<a href="#">CLIMATIC CHANGE</a>	0165-0009	7121	3.016	4.433	0.990	201	6.6	0.02418	1.825
<input type="checkbox"/>	36	<a href="#">ECOL INDIC</a>	1470-160X	1485	2.967	3.058	0.599	137	3.1	0.00551	0.780
<input type="checkbox"/>	37	<a href="#">REV ENVIRON CONTAM T</a>	0179-5953	924	2.935	3.232	0.885	26	9.2	0.00145	0.910
<input type="checkbox"/>	38	<a href="#">ENVIRON MODELL SOFTW</a>	1364-8152	3248	2.871	2.900	0.620	184	4.2	0.01094	0.765
<input type="checkbox"/>	39	<a href="#">ENVIRON SCI POLLUT R</a>	0944-1344	1580	2.870	2.733	0.453	159	4.4	0.00438	0.662
<input type="checkbox"/>	40	<a href="#">AGR ECOSYST ENVIRON</a>	0167-8809	8919	2.790	3.741	0.644	250	6.6	0.02278	1.102

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)



**Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Galicia (NW, Spain).**

Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; González-Warleta, M.; Mezo, M.

***Veterinary Parasitology*, 179: 216-219. 2011.**



ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>Journal Citation Reports<sup>®</sup>

2010 JCR Science Edition

## Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)Journals from: **subject categories VETERINARY SCIENCES** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)Sorted by: **Impact Factor** [SORT AGAIN](#)

Journals 1 - 20 (of 145)

Page 1 of 8

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data						Eigenfactor <sup>TM</sup> Metrics	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>TM</sup> Score	Article Influence <sup>TM</sup> Score
<input type="checkbox"/>	1	<a href="#">VET RES</a>	0928-4249	2406	3.765	4.110	0.667	75	5.8	0.00656	1.158
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">COMP IMMUNOL MICROB</a>	0147-9571	989	3.605	2.539	0.364	44	6.3	0.00223	0.687
<input type="checkbox"/>	3	<a href="#">VET MICROBIOL</a>	0378-1135	9742	3.256	3.121	0.647	414	5.8	0.02345	0.797
<input type="checkbox"/>	4	<a href="#">FISH SHELLFISH IMMUN</a>	1050-4648	4285	3.044	3.313	0.352	264	4.3	0.00981	0.628
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">VET J</a>	1090-0233	3671	2.796	2.644	0.747	241	3.8	0.01142	0.663
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">ILAR J</a>	1084-2020	864	2.692	2.584	2.444	36	4.8	0.00227	0.705
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">TRANSBOUND EMERG DIS</a>	1865-1674	232	2.448	2.448	0.268	71	2.1	0.00105	0.620
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">BMC VET RES</a>	1746-6148	467	2.371		0.509	57	2.8	0.00225	
<input checked="" type="checkbox"/>	9	<a href="#">VET PARASITOL</a>	0304-4017	9727	2.331	2.458	0.412	439	5.9	0.01912	0.505
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">MED MYCOL</a>	1369-3786	2597	2.329	2.284	0.348	178	5.2	0.00781	0.614
<input type="checkbox"/>	11	<a href="#">J VET INTERN MED</a>	0891-6640	4419	2.277	2.352	0.338	198	6.0	0.00883	0.500
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">ZOOZOSES PUBLIC HLTH</a>	1863-1959	467	2.220	2.312	0.291	110	2.5	0.00220	0.610
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">VET IMMUNOL IMMUNOP</a>	0165-2427	5359	2.176	2.221	0.352	244	6.6	0.01033	0.499
<input type="checkbox"/>	14	<a href="#">PREV VET MED</a>	0167-5877	3586	2.070	2.202	0.393	173	7.3	0.00713	0.546
<input type="checkbox"/>	15	<a href="#">THERIOGENOLOGY</a>	0093-691X	11630	2.045	2.506	0.329	334	7.8	0.01704	0.500
<input type="checkbox"/>	16	<a href="#">AVIAN PATHOL</a>	0307-9457	2429	1.967	2.058	0.191	68	8.5	0.00367	0.521
<input type="checkbox"/>	17	<a href="#">J MED ENTOMOL</a>	0022-2585	5739	1.925	2.257	0.306	160	8.9	0.01242	0.747
<input type="checkbox"/>	18	<a href="#">MED VET ENTOMOL</a>	0269-283X	2245	1.895	2.210	0.200	60	9.0	0.00389	0.702
<input type="checkbox"/>	19	<a href="#">JAVMA-J AM VET MED A</a>	0003-1488	11635	1.860	2.067	0.741	158	>10.0	0.01101	0.509
<input type="checkbox"/>	20	<a href="#">EQUINE VET J</a>	0425-1644	5273	1.799	2.411	0.281	228	>10.0	0.00455	0.419

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)



ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>Journal Citation Reports<sup>®</sup>

2010 JCR Science Edition

## Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)Journals from: **subject categories PARASITOLOGY**[VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by:

Impact Factor

[SORT AGAIN](#)

Journals 1 - 20 (of 32)

Page 1 of 2

[MARK ALL](#)[UPDATE MARKED LIST](#)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data						Eigenfactor <sup>TM</sup> Metrics	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>TM</sup> Score	Article Influence <sup>TM</sup> Score
<input type="checkbox"/>	1	<a href="#">PLOS PATHOG</a>	1553-7366	10833	9.079	9.675	1.462	520	2.3	0.08301	4.134
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">TRENDS PARASITOL</a>	1471-4922	4464	4.906	5.285	1.120	83	5.1	0.01685	1.730
<input type="checkbox"/>	3	<a href="#">PLOS NEGLECT TROP D</a>	1935-2727	2020	4.752	4.849	0.609	335	1.9	0.01140	1.580
<input type="checkbox"/>	4	<a href="#">INT J PARASITOL</a>	0020-7519	8331	3.822	3.938	0.895	171	7.7	0.01810	1.180
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">MALARIA J</a>	1475-2875	4012	3.489	3.551	0.594	374	2.7	0.01855	0.999
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">MOL BIOCHEM PARASIT</a>	0166-6851	7649	2.875	2.963	0.686	118	9.3	0.01483	0.985
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">PARASITOLOGY</a>	0031-1820	7396	2.522	2.530	0.560	175	9.5	0.01354	0.773
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">PARASITE IMMUNOL</a>	0141-9838	2420	2.357	2.299	0.430	79	8.3	0.00538	0.723
<input checked="" type="checkbox"/>	9	<a href="#">VET PARASITOL</a>	0304-4017	9727	2.331	2.458	0.412	439	5.9	0.01912	0.505
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">ACTA TROP</a>	0001-706X	4527	2.262	2.500	0.928	153	6.9	0.01011	0.706
<input type="checkbox"/>	11	<a href="#">PARASITOL INT</a>	1383-5769	1190	2.259	2.366	0.396	106	4.2	0.00444	0.635
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">PARASITE VECTOR</a>	1756-3305	272	2.130	2.140	0.504	113	1.7	0.00114	0.588
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">MEM I OSWALDO CRUZ</a>	0074-0276	5385	2.058	2.081	0.087	183	7.9	0.01047	0.563
<input type="checkbox"/>	14	<a href="#">EXP PARASITOL</a>	0014-4894	4218	1.869	1.841	0.767	223	9.4	0.00803	0.477
<input type="checkbox"/>	15	<a href="#">PARASITOL RES</a>	0932-0113	5741	1.812	1.723	0.344	366	4.8	0.01407	0.395
<input type="checkbox"/>	16	<a href="#">PARASITE</a>	1252-607X	702	1.710	1.368	0.061	49	5.7	0.00211	0.417
<input type="checkbox"/>	17	<a href="#">ADV PARASIT</a>	0065-308X	1435	1.683	4.311	4.724	29	8.0	0.00333	1.621
<input type="checkbox"/>	18	<a href="#">J HELMINTHOL</a>	0022-149X	1231	1.544	1.544	0.338	65	9.3	0.00247	0.450
<input type="checkbox"/>	19	<a href="#">FOLIA PARASIT</a>	0015-5683	921	1.533	1.464	0.824	34	9.2	0.00169	0.448
<input type="checkbox"/>	20	<a href="#">ANN TROP MED PARASIT</a>	0003-4983	2782	1.288	1.579	0.274	73	>10.0	0.00458	0.534

[MARK ALL](#)[UPDATE MARKED LIST](#)

**Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals.**

Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, L.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M.

***Water Research*, 43: 4133-4142. 2009.**



ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>Journal Citation Reports<sup>®</sup>

2009 JCR Science Edition

## Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)Journals from: subject categories **ENGINEERING, ENVIRONMENTAL** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)Sorted by:  

Journals 1 - 20 (of 42)

Page 1 of 3



Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data					Cited Half-life	Eigenfactor <sup>TM</sup> Metrics	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles		Eigenfactor <sup>TM</sup> Score	Article Influence <sup>TM</sup> Score
<input type="checkbox"/>	1	<a href="#">APPL CATAL B-ENVIRON</a>	0926-3373	15299	5.252	5.913	0.670	454	5.3	0.04124	1.400
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">ENVIRON SCI TECHNOL</a>	0013-936X	68301	4.630	5.438	0.752	1373	6.3	0.17786	1.458
<input checked="" type="checkbox"/>	3	<a href="#">WATER RES</a>	0043-1354	33139	4.355	4.828	0.550	524	7.7	0.05949	1.188
<input type="checkbox"/>	4	<a href="#">J HAZARD MATER</a>	0304-3894	21180	4.144	4.360	0.646	2371	3.0	0.05725	0.772
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">INT J GREENH GAS CON</a>	1750-5836	418	3.644	3.654	0.481	79	1.9	0.00250	1.154
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">ENVIRON MODELL SOFTW</a>	1364-8152	2740	3.085	2.681	0.740	150	4.0	0.00899	0.629
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">INDOOR AIR</a>	0905-6947	1833	2.891	3.539	0.250	52	5.5	0.00805	1.311
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">ECOL ENG</a>	0925-8574	3200	2.745	3.218	0.665	191	6.0	0.00598	0.626
<input type="checkbox"/>	9	<a href="#">INT J LIFE CYCLE ASS</a>	0948-3349	1292	2.636	2.974	0.317	60	4.7	0.00381	0.676
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">AMBIO</a>	0044-7447	3324	2.486	2.602	0.776	58	8.0	0.00877	1.023
<input type="checkbox"/>	11	<a href="#">WASTE MANAGE</a>	0956-053X	4660	2.433	2.924	0.380	376	4.9	0.01075	0.580
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">ENVIRON CHEM LETT</a>	1610-3653	406	2.109	1.831	0.208	48	3.7	0.00184	0.483
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">RESOUR CONSERV RECY</a>	0921-3449	2119	1.987	2.209	0.163	86	6.7	0.00510	0.568
<input type="checkbox"/>	14	<a href="#">J CLEAN PROD</a>	0959-6526	2490	1.867	2.105	0.556	207	4.1	0.00753	0.464
<input type="checkbox"/>	15	<a href="#">BUILD ENVIRON</a>	0360-1323	3488	1.797	1.749	0.401	269	4.3	0.01273	0.518
<input type="checkbox"/>	16	<a href="#">J AIR WASTE MANAGE</a>	1047-3289	3782	1.670	1.924	0.293	133	7.6	0.00953	0.629
<input type="checkbox"/>	17	<a href="#">ENVIRON GEOCHEM HLTH</a>	0269-4042	954	1.622	1.885	0.253	83	5.6	0.00261	0.481
<input type="checkbox"/>	18	<a href="#">J AM WATER RESOUR AS</a>	1093-474X	2424	1.618	1.718	0.324	111	6.9	0.00604	0.514
<input type="checkbox"/>	19	<a href="#">J POLYM ENVIRON</a>	1566-2543	627	1.571	1.699	0.027	37	5.7	0.00188	0.468
<input type="checkbox"/>	20	<a href="#">STOCH ENV RES RISK A</a>	1436-3240	534	1.419	1.395	0.143	98	4.1	0.00217	0.407

ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>Journal Citation Reports<sup>®</sup>

2009 JCR Science Edition

## Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)Journals from: **subject categories ENVIRONMENTAL SCIENCES** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)Sorted by: **Impact Factor** [SORT AGAIN](#)

Journals 1 - 20 (of 181)

Page 1 of 10

[MARK ALL](#)
[UPDATE MARKED LIST](#)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data <sup>1</sup>						Eigenfactor <sup>TM</sup> Metrics <sup>1</sup>	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>TM</sup> Score	Article Influence <sup>TM</sup> Score
<input type="checkbox"/>	1	<a href="#">ENERG ENVIRON SCI</a>	1754-5692	478	8.500	8.526	1.195	128	1.3	0.00236	2.990
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">CRIT REV ENV SCI TEC</a>	1064-3389	1303	7.091	8.102	0.208	24	8.4	0.00272	2.215
<input type="checkbox"/>	3	<a href="#">FRONT ECOL ENVIRON</a>	1540-9295	2211	6.922	6.508	1.804	51	4.0	0.01719	3.202
<input type="checkbox"/>	4	<a href="#">ENVIRON HEALTH PERSP</a>	0091-6765	21856	6.191	7.103	1.201	293	6.0	0.06446	2.093
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">GLOBAL CHANGE BIOL</a>	1354-1013	10842	5.561	6.600	1.204	230	4.9	0.05297	2.643
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">ENVIRON INT</a>	0160-4120	5746	4.786	4.939	1.012	165	5.3	0.01805	1.312
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">CONSERV BIOL</a>	0888-8892	14167	4.666	5.261	0.512	160	8.4	0.03525	1.995
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">ENVIRON SCI TECHNOL</a>	0013-936X	68301	4.630	5.438	0.752	1373	6.3	0.17786	1.458
<input checked="" type="checkbox"/>	9	<a href="#">WATER RES</a>	0043-1354	33139	4.355	4.828	0.550	524	7.7	0.05949	1.188
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">GLOBAL BIOGEOCHEM CY</a>	0886-6236	7213	4.294	5.020	0.663	98	7.3	0.02906	2.571
<input type="checkbox"/>	11	<a href="#">J HAZARD MATER</a>	0304-3894	21180	4.144	4.360	0.646	2371	3.0	0.05725	0.772
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">INT J HYDROGEN ENERG</a>	0360-3199	15069	3.945	4.452	0.755	1112	3.5	0.03032	0.685
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">ECOL APPL</a>	1051-0761	12382	3.672	4.662	0.795	166	7.9	0.03591	1.871
<input type="checkbox"/>	14	<a href="#">ANNU REV ENV RESOUR</a>	1543-5938	659	3.657	6.573	0.278	18	4.6	0.00484	3.103
<input type="checkbox"/>	15	<a href="#">CLIMATIC CHANGE</a>	0165-0009	5849	3.635	4.184	0.729	155	6.4	0.02502	1.909
<input type="checkbox"/>	16	<a href="#">J TOXICOL ENV HEAL B</a>	1093-7404	724	3.617	4.841	0.440	25	5.2	0.00256	1.396
<input type="checkbox"/>	17	<a href="#">REMOTE SENS ENVIRON</a>	0034-4257	14332	3.612	4.757	0.858	240	6.9	0.03694	1.435
<input type="checkbox"/>	18	<a href="#">APPL CATAL A-GEN</a>	0926-860X	23373	3.564	3.912	0.549	576	6.3	0.05669	0.999
<input type="checkbox"/>	19	<a href="#">ECOTOXICOLOGY</a>	0963-9292	1648	3.507	2.922	0.174	132	4.8	0.00559	0.807
<input type="checkbox"/>	20	<a href="#">ENVIRON POLLUT</a>	0269-7491	15486	3.426	3.904	0.777	444	5.6	0.04243	1.017

[MARK ALL](#)
[UPDATE MARKED LIST](#)

ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>Journal Citation Reports<sup>®</sup>

2009 JCR Science Edition

## Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)Journals from: subject categories WATER RESOURCES [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)Sorted by: Impact Factor [SORT AGAIN](#)

Journals 1 - 20 (of 66)

Page 1 of 4

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data <sup>i</sup>						Eigenfactor <sup>TM</sup> Metrics <sup>i</sup>	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>TM</sup> Score	Article Influence <sup>TM</sup> Score
<input checked="" type="checkbox"/>	1	<a href="#">WATER RES</a>	0043-1354	33139	4.355	4.828	0.550	524	7.7	0.05949	1.188
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">HYDROL EARTH SYST SC</a>	1027-5606	2066	2.462	2.670	0.626	179	4.2	0.00839	0.869
<input type="checkbox"/>	3	<a href="#">WATER RESOUR RES</a>	0043-1397	24059	2.447	2.902	0.476	429	>10.0	0.04014	0.995
<input type="checkbox"/>	4	<a href="#">J HYDROL</a>	0022-1694	17279	2.433	3.171	0.563	497	8.1	0.03967	0.966
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">ADV WATER RESOUR</a>	0309-1708	3674	2.354	2.725	0.486	144	6.1	0.01337	1.002
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">DESALINATION</a>	0011-9164	11695	2.034	2.051	0.165	899	5.0	0.02625	0.386
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">AGR WATER MANAGE</a>	0378-3774	3386	2.016	2.464	0.337	202	5.3	0.00974	0.621
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">WATER RESOUR MANAG</a>	0920-4741	1275	2.013	2.218	0.164	171	4.1	0.00316	0.414
<input type="checkbox"/>	9	<a href="#">J CONTAM HYDROL</a>	0169-7722	3382	2.010	2.345	0.548	104	8.1	0.00763	0.770
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">VADOSE ZONE J</a>	1539-1663	1516	1.991	2.127	0.660	103	4.1	0.00831	0.711
<input type="checkbox"/>	11	<a href="#">CATENA</a>	0341-8162	3550	1.933	2.403	0.267	105	8.1	0.00836	0.776
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">HYDROL PROCESS</a>	0885-6087	7644	1.870	2.389	0.503	302	6.5	0.02162	0.738
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">ENVIRON TOXICOL</a>	1520-4081	1720	1.831	2.041	0.286	70	6.2	0.00439	0.536
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">GROUND WATER</a>	0017-467X	3267	1.831	1.861	0.361	83	>10.0	0.00631	0.648
<input type="checkbox"/>	15	<a href="#">IRRIGATION SCI</a>	0342-7188	823	1.753	2.022	0.271	48	8.8	0.00210	0.730
<input type="checkbox"/>	16	<a href="#">WATER AIR SOIL POLL</a>	0049-6979	7729	1.676	1.862	0.208	288	9.5	0.01207	0.505
<input type="checkbox"/>	17	<a href="#">ENVIRON GEOCHEM HLTH</a>	0269-4042	954	1.622	1.885	0.253	83	5.6	0.00261	0.481
<input type="checkbox"/>	18	<a href="#">J AM WATER RESOUR AS</a>	1093-474X	2424	1.618	1.718	0.324	111	6.9	0.00604	0.514
<input type="checkbox"/>	19	<a href="#">RIVER RES APPL</a>	1535-1459	1148	1.599	2.270	0.182	88	4.3	0.00474	0.603
<input type="checkbox"/>	20	<a href="#">J HYDRAUL ENG-ASCE</a>	0733-9429	5878	1.478	1.889	0.132	106	>10.0	0.00947	0.649

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)





**Contribution of treated wastewater to the  
contamination of recreational river areas with  
*Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*.**

Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, L.; Almeida, A.; González-  
Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M.

***Water Research*, 42: 3528-3538. 2008.**



ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>Journal Citation Reports<sup>®</sup>

2008 JCR Science Edition

## Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)Journals from: subject categories ENGINEERING, ENVIRONMENTAL [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)Sorted by:  

Journals 1 - 20 (of 38)



Page 1 of 2

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data <sup>i</sup>					Eigenfactor <sup>TM</sup> Metrics <sup>i</sup>		
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>TM</sup> Score	Article Influence <sup>TM</sup> Score
<input type="checkbox"/>	1	<a href="#">APPL CATAL B-ENVIRON</a>	0926-3373	12204	4.853	5.664	0.659	358	5.1	0.04348	1.523
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">ENVIRON SCI TECHNOL</a>	0013-936X	58565	4.458	5.075	0.624	1378	6.3	0.17207	1.461
<input checked="" type="checkbox"/>	3	<a href="#">WATER RES</a>	0043-1354	28053	3.587	4.274	0.527	509	7.4	0.06035	1.120
<input type="checkbox"/>	4	<a href="#">INDOOR AIR</a>	0905-6947	1621	3.151	3.085	0.220	50	5.1	0.00663	1.021
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">J HAZARD MATER</a>	0304-3894	11402	2.975	3.212	0.393	1177	3.0	0.03793	0.662
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">ENVIRON MODELL SOFTW</a>	1364-8152	2180	2.659	2.444	0.570	128	3.5	0.00906	0.635
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">WASTE MANAGE</a>	0956-053X	3379	2.208	2.685	0.255	306	5.4	0.00975	0.647
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">AMBIO</a>	0044-7447	3115	2.092	2.230	0.802	81	8.1	0.00882	0.934
<input type="checkbox"/>	9	<a href="#">J AIR WASTE MANAGE</a>	1047-3289	3694	2.020	1.995	0.622	135	7.2	0.01075	0.664
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">ECOL ENG</a>	0925-8574	2139	1.836	2.300	0.420	100	6.4	0.00498	0.543
<input type="checkbox"/>	11	<a href="#">INT J LIFE CYCLE ASS</a>	0948-3349	906	1.828	2.115	0.545	55	4.7	0.00274	0.472
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">INT J GREENH GAS CON</a>	1750-5836	113	1.646	1.646	0.571	56	1.3	0.00047	0.439
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">ENVIRON CHEM LETT</a>	1610-3653	293	1.366		0.161	31	3.6	0.00202	
<input type="checkbox"/>	14	<a href="#">J CLEAN PROD</a>	0959-6526	1701	1.362	1.774	0.393	214	4.0	0.00561	0.386
<input type="checkbox"/>	15	<a href="#">COLD REG SCI TECHNOL</a>	0165-232X	977	1.264	1.423	0.490	100	6.4	0.00216	0.332
<input type="checkbox"/>	16	<a href="#">ENVIRON GEOCHEM HLTH</a>	0269-4042	723	1.238	1.467	0.295	61	5.9	0.00252	0.475
<input type="checkbox"/>	17	<a href="#">J AM WATER RESOUR AS</a>	1093-474X	1963	1.208	1.451	0.368	117	6.6	0.00709	0.570
<input type="checkbox"/>	18	<a href="#">BUILD ENVIRON</a>	0360-1323	2425	1.192	1.291	0.251	219	4.8	0.01170	0.478
<input type="checkbox"/>	19	<a href="#">RESOUR CONSERV RECY</a>	0921-3449	1582	1.133	1.689	0.151	106	7.1	0.00397	0.464
<input type="checkbox"/>	20	<a href="#">J POLYM ENVIRON</a>	1566-2543	505	1.129	1.481	0.029	34	5.6	0.00143	0.357

ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>Journal Citation Reports<sup>®</sup>

2008 JCR Science Edition

## Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)Journals from: subject categories ENVIRONMENTAL SCIENCES [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)Sorted by:  

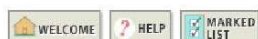
Journals 1 - 20 (of 163)

Page 1 of 9



Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data <sup>1</sup>						Eigenfactor <sup>TM</sup> Metrics <sup>1</sup>	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>TM</sup> Score	Article Influence <sup>TM</sup> Score
<input type="checkbox"/>	1	<a href="#">CRIT REV ENV SCI TEC</a>	1064-3389	1081	7.409	6.097	0.273	11	8.6	0.00257	1.871
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">ENVIRON HEALTH PERSP</a>	0091-6765	19757	6.123	7.069	0.897	272	5.6	0.06530	2.000
<input type="checkbox"/>	3	<a href="#">GLOBAL CHANGE BIOL</a>	1354-1013	9162	5.876	6.709	0.866	224	4.7	0.05630	2.864
<input type="checkbox"/>	4	<a href="#">FRONT ECOL ENVIRON</a>	1540-9295	1586	5.065	5.926	1.286	49	3.6	0.01551	2.733
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">CONSERV BIOL</a>	0888-8892	13171	4.705	5.393	0.500	162	8.0	0.03918	2.073
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">ANNU REV ENV RESOUR</a>	1543-5938	493	4.667	6.726	0.050	20	3.8	0.00556	3.438
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">ENVIRON SCI TECHNOL</a>	0013-936X	58565	4.458	5.075	0.624	1378	6.3	0.17207	1.461
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">GLOBAL BIOGEOCHEM CY</a>	0886-6236	7029	4.090	4.993	0.739	115	6.8	0.03088	2.538
<input type="checkbox"/>	9	<a href="#">GLOBAL ENVIRON CHANG</a>	0959-3780	1291	3.955	4.272	0.524	63	5.1	0.00564	1.611
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">REMOTE SENS ENVIRON</a>	0034-4257	15619	3.943	5.515	0.852	330	6.8	0.03544	1.437
<input type="checkbox"/>	11	<a href="#">ECOL APPL</a>	1051-0761	11506	3.628	4.897	1.243	185	7.5	0.04114	2.088
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">GEOBIOLOGY</a>	1472-4677	465	3.596	4.298	0.375	48	3.3	0.00516	2.237
<input checked="" type="checkbox"/>	13	<a href="#">WATER RES</a>	0043-1354	28053	3.587	4.274	0.527	509	7.4	0.06035	1.120
<input type="checkbox"/>	14	<a href="#">BIOL CONSERV</a>	0006-3207	11956	3.566	3.819	0.403	283	5.9	0.04384	1.258
<input type="checkbox"/>	15	<a href="#">ENVIRON INT</a>	0160-4120	4513	3.516	4.573	0.586	133	5.0	0.01898	1.325
<input type="checkbox"/>	16	<a href="#">INT J HYDROGEN ENERG</a>	0360-3199	9744	3.452	4.028	0.634	902	4.4	0.02308	0.755
<input type="checkbox"/>	17	<a href="#">J ENVIRON SCI HEAL C</a>	1059-0501	134	3.353	2.722	0.182	11	3.4	0.00058	0.729
<input type="checkbox"/>	18	<a href="#">REV ENVIRON CONTAM T</a>	0179-5953	879	3.321	3.460	0.433	30	9.8	0.00161	1.153
<input type="checkbox"/>	19	<a href="#">J TOXICOL ENV HEAL B</a>	1093-7404	641	3.316	4.341	1.167	24	5.0	0.00205	1.127
<input type="checkbox"/>	20	<a href="#">CLIMATIC CHANGE</a>	0165-0009	5038	3.202	3.909	1.046	151	6.5	0.02309	1.831

ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>Journal Citation Reports<sup>®</sup>

2008 JCR Science Edition

## Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)Journals from: **subject categories WATER RESOURCES** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)Sorted by: **Impact Factor** [SORT AGAIN](#)

Journals 1 - 20 (of 60)

Page 1 of 3

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data						Eigenfactor <sup>TM</sup> Metrics	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>TM</sup> Score	Article Influence <sup>TM</sup> Score
<input checked="" type="checkbox"/>	1	<a href="#">WATER RES</a>	0043-1354	28053	3.587	4.274	0.527	509	7.4	0.06035	1.120
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">WATER RESOUR RES</a>	0043-1397	22302	2.398	2.801	0.489	505	>10.0	0.04120	1.039
<input type="checkbox"/>	3	<a href="#">J HYDROL</a>	0022-1694	14510	2.305	2.868	0.309	404	8.1	0.04008	0.986
<input type="checkbox"/>	4	<a href="#">ADV WATER RESOUR</a>	0309-1708	2918	2.235	2.440	0.423	137	5.8	0.01317	0.987
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">HYDROL EARTH SYST SC</a>	1027-5606	1632	2.167	2.131	0.365	104	4.9	0.00829	0.862
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">J CONTAM HYDROL</a>	0169-7722	3230	2.106	2.313	0.433	97	7.4	0.00938	0.812
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">HYDROL PROCESS</a>	0885-6087	7038	2.002	2.539	0.345	415	6.6	0.02328	0.873
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">RIVER RES APPL</a>	1535-1459	918	1.959	2.436	0.185	92	3.9	0.00532	0.727
<input type="checkbox"/>	9	<a href="#">ENVIRON TOXICOL</a>	1520-4081	1566	1.899	2.274	0.283	92	5.7	0.00447	0.574
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">IRRIGATION SCI</a>	0342-7188	654	1.891	2.145	0.245	49	8.2	0.00194	0.750
<input type="checkbox"/>	11	<a href="#">CATENA</a>	0341-8162	3097	1.874	2.290	0.422	147	7.9	0.00773	0.716
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">AGR WATER MANAGE</a>	0378-3774	2408	1.646	1.829	0.196	138	5.4	0.00887	0.567
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">AQUAT CONSERV</a>	1052-7613	1201	1.619	2.408	0.383	107	5.8	0.00400	0.736
<input type="checkbox"/>	14	<a href="#">VADOSE ZONE J</a>	1539-1663	1226	1.441		1.123	122	4.0	0.00840	
<input type="checkbox"/>	15	<a href="#">WATER AIR SOIL POLL</a>	0049-6979	6961	1.398	1.779	0.205	249	9.5	0.01294	0.527
<input type="checkbox"/>	16	<a href="#">WATER RESOUR MANAG</a>	0920-4741	701	1.350	1.539	0.062	112	4.3	0.00257	0.413
<input type="checkbox"/>	17	<a href="#">NAT HAZARD EARTH SYS</a>	1561-8633	754	1.345		0.206	131	3.7	0.00506	
<input type="checkbox"/>	18	<a href="#">GROUND WATER</a>	0017-467X	2909	1.304	1.664	0.405	84	>10.0	0.00665	0.659
<input type="checkbox"/>	19	<a href="#">J WATER RES PL-ASCE</a>	0733-9496	1516	1.275	2.201	0.148	61	8.4	0.00454	0.806
<input type="checkbox"/>	20	<a href="#">J HYDRAUL ENG-ASCE</a>	0733-9429	5648	1.272	1.885	0.243	185	>10.0	0.00847	0.612

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)



**Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water.**

Castro-Hermida, J.A.; [García-Presedo, I.](#); Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M.

***Science of the Total Environment*, 405: 45-53. 2008.**





ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>Journal Citation Reports<sup>®</sup>

2008 JCR Science Edition

## Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)Journals from: subject categories ENVIRONMENTAL SCIENCES [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)Sorted by: Impact Factor [SORT AGAIN](#)

Journals 21 - 40 (of 163)

Page 2 of 9

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data						Eigenfactor <sup>TM</sup> Metrics	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>TM</sup> Score	Article Influence <sup>TM</sup> Score
<input type="checkbox"/>	21	<a href="#">APPL CATAL A-GEN</a>	0926-860X	20380	3.190	3.580	0.389	501	5.9	0.06361	1.013
<input type="checkbox"/>	22	<a href="#">ENVIRON POLLUT</a>	0269-7491	12610	3.135	3.628	0.336	521	5.8	0.03885	0.996
<input type="checkbox"/>	23	<a href="#">CHEMOSPHERE</a>	0045-6535	25916	3.054	3.445	0.399	1066	5.3	0.07719	0.847
<input type="checkbox"/>	24	<a href="#">ENVIRON RES</a>	0013-9351	4797	3.038	3.377	0.787	150	6.7	0.01306	0.958
<input type="checkbox"/>	25	<a href="#">J HAZARD MATER</a>	0304-3894	11402	2.975	3.212	0.393	1177	3.0	0.03793	0.662
<input type="checkbox"/>	26	<a href="#">BIOGEOCHEMISTRY</a>	0168-2563	5324	2.961	3.912	0.361	97	7.9	0.01792	1.618
<input type="checkbox"/>	27	<a href="#">ATMOS ENVIRON</a>	1352-2310	25614	2.890	3.423	0.512	773	6.5	0.07246	0.978
<input type="checkbox"/>	28	<a href="#">AGR ECOSYST ENVIRON</a>	0167-8809	6468	2.884	2.980	0.425	186	6.2	0.02259	1.000
<input type="checkbox"/>	29	<a href="#">ENVIRON REV</a>	1181-8700	498	2.765		0.375	8	8.3	0.00124	
<input type="checkbox"/>	30	<a href="#">AEROSOL SCI TECH</a>	0278-6826	3636	2.686	2.927	0.303	89	7.3	0.01264	1.088
<input type="checkbox"/>	31	<a href="#">ENVIRON MODELL SOFTW</a>	1364-8152	2180	2.659	2.444	0.570	128	3.5	0.00906	0.635
<input type="checkbox"/>	32	<a href="#">ECOTOX ENVIRON SAFE</a>	0147-6513	4447	2.590	2.859	0.228	281	6.5	0.01130	0.719
<input checked="" type="checkbox"/>	33	<a href="#">SCI TOTAL ENVIRON</a>	0048-9697	17331	2.579	3.148	0.431	673	6.8	0.04924	0.943
<input type="checkbox"/>	34	<a href="#">MAR POLLUT BULL</a>	0025-326X	8373	2.562	2.979	0.274	317	6.5	0.02161	0.765
<input type="checkbox"/>	35	<a href="#">ENVIRON SCI POLLUT R</a>	0944-1344	1069	2.492	2.140	0.424	66	4.8	0.00340	0.524
<input type="checkbox"/>	36	<a href="#">ENVIRON TOXICOL CHEM</a>	0730-7268	12344	2.420	2.710	0.439	314	7.1	0.03071	0.752
<input type="checkbox"/>	37	<a href="#">WATER RESOUR RES</a>	0043-1397	22302	2.398	2.801	0.489	505	>10.0	0.04120	1.039
<input type="checkbox"/>	38	<a href="#">ECOTOXICOLOGY</a>	0963-9292	1330	2.355	2.493	0.619	84	5.1	0.00439	0.674
<input type="checkbox"/>	39	<a href="#">ENVIRON CHEM</a>	1448-2517	816	2.317		0.600	50	3.9	0.00353	
<input type="checkbox"/>	40	<a href="#">ECOHEALTH</a>	1612-9202	313	2.315		0.250	36	2.7	0.00283	

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)



***Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies  
of Galicia, Spain.**

Castro-Hermida, J.A.; [García-Presedo, I.](#); González-Warleta, M.;  
Mezo, M.

***Water Research*, 44: 5887-5896. 2010.**



ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>Journal Citation Reports<sup>®</sup>

2010 JCR Science Edition

## Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)Journals from: subject categories ENGINEERING, ENVIRONMENTAL [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)Sorted by:  

Journals 1 - 20 (of 45)

Page 1 of 3



Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data						Eigenfactor <sup>TM</sup> Metrics	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>TM</sup> Score	Article Influence <sup>TM</sup> Score
<input type="checkbox"/>	1	<a href="#">ENERGY EDUC SCI TECH</a>	1301-8361	555	9.333		3.206	34	1.5	0.00084	
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">ENVIRON SCI TECHNOL</a>	0013-936X	72582	4.827	5.398	0.747	1400	6.2	0.18254	1.490
<input type="checkbox"/>	3	<a href="#">APPL CATAL B-ENVIRON</a>	0926-3373	16122	4.749	5.439	0.698	394	5.2	0.04544	1.425
<input checked="" type="checkbox"/>	4	<a href="#">WATER RES</a>	0043-1354	34724	4.546	4.966	0.656	546	7.9	0.05965	1.247
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">INT J GREENH GAS CON</a>	1750-5836	940	4.081	4.787	0.532	111	2.6	0.00431	1.214
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">J HAZARD MATER</a>	0304-3894	28060	3.723	3.997	0.571	1638	3.0	0.08923	0.810
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">INT J LIFE CYCLE ASS</a>	0948-3349	1536	3.148	3.233	0.337	92	4.8	0.00452	0.809
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">CHEM ENG J</a>	1385-8947	9963	3.074	3.171	0.374	805	3.7	0.03082	0.780
<input type="checkbox"/>	9	<a href="#">ENVIRON MODELL SOFTW</a>	1364-8152	3248	2.871	2.900	0.620	184	4.2	0.01094	0.765
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">J CLEAN PROD</a>	0959-6526	3428	2.430	2.600	0.573	225	4.1	0.01036	0.598
<input type="checkbox"/>	11	<a href="#">WASTE MANAGE</a>	0956-053X	5136	2.358	2.666	0.252	306	4.5	0.01388	0.618
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">ECOL ENG</a>	0925-8574	3414	2.203	2.807	0.724	196	5.7	0.00723	0.624
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">BUILD ENVIRON</a>	0360-1323	4278	2.131	2.000	0.552	288	4.1	0.01450	0.574
<input type="checkbox"/>	14	<a href="#">ENVIRON CHEM LETT</a>	1610-3653	550	2.051	2.161	0.189	53	4.1	0.00221	0.573
<input type="checkbox"/>	15	<a href="#">INDOOR AIR</a>	0905-6947	1884	2.029	3.066	0.458	48	6.4	0.00494	0.984
<input type="checkbox"/>	16	<a href="#">RESOUR CONSERV RECY</a>	0921-3449	2209	1.974	2.350	0.263	175	6.0	0.00558	0.636
<input type="checkbox"/>	17	<a href="#">STOCH ENV RES RISK A</a>	1436-3240	820	1.777	1.700	0.196	97	4.0	0.00283	0.460
<input type="checkbox"/>	18	<a href="#">AMBIO</a>	0044-7447	3739	1.705	2.847	0.196	56	8.7	0.00746	0.999
<input type="checkbox"/>	19	<a href="#">ENVIRON GEOCHEM HLTH</a>	0269-4042	1122	1.667	1.849	0.241	54	6.0	0.00270	0.465
<input type="checkbox"/>	20	<a href="#">J AIR WASTE MANAGE</a>	1047-3289	3623	1.567	1.923	0.235	136	7.8	0.00847	0.598

ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>Journal Citation Reports<sup>®</sup>

2010 JCR Science Edition

## Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)Journals from: subject categories ENVIRONMENTAL SCIENCES [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)Sorted by:  

Journals 1 - 20 (of 193)

Page 1 of 10



Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data						Eigenfactor <sup>TM</sup> Metrics	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>TM</sup> Score	Article Influence <sup>TM</sup> Score
<input type="checkbox"/>	1	<a href="#">ENERG ENVIRON SCI</a>	1754-5692	1766	9.488	9.488	0.944	198	1.7	0.00941	2.922
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">FRONT ECOL ENVIRON</a>	1540-9295	2994	8.820	7.931	1.309	55	4.1	0.01592	3.132
<input type="checkbox"/>	3	<a href="#">GLOBAL CHANGE BIOL</a>	1354-1013	13987	6.346	7.814	1.378	262	5.1	0.06034	3.049
<input type="checkbox"/>	4	<a href="#">ENVIRON HEALTH PERSP</a>	0091-6765	26174	6.087	7.024	1.289	270	7.1	0.06206	2.103
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">GLOBAL BIOGEOCHEM CY</a>	0886-6236	8761	5.263	5.936	0.853	102	7.7	0.02896	2.881
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">GLOBAL ENVIRON CHANG</a>	0959-3780	2722	4.918	7.840	0.731	67	5.1	0.00955	2.390
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">CONSERV BIOL</a>	0888-8892	15680	4.894	5.963	0.789	171	8.4	0.03558	2.160
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">J ENVIRON SCI HEAL C</a>	1059-0501	283	4.840	4.380	0.091	11	3.4	0.00114	1.176
<input type="checkbox"/>	9	<a href="#">ENVIRON SCI TECHNOL</a>	0013-936X	72582	4.827	5.398	0.747	1400	6.2	0.18254	1.490
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">ENVIRON INT</a>	0160-4120	6437	4.691	4.786	0.623	114	5.8	0.01762	1.322
<input checked="" type="checkbox"/>	11	<a href="#">WATER RES</a>	0043-1354	34724	4.546	4.966	0.656	546	7.9	0.05965	1.247
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">ECOL APPL</a>	1051-0761	13617	4.276	5.067	0.621	177	8.1	0.03610	2.036
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">J TOXICOL ENV HEAL B</a>	1093-7404	807	4.041	4.583	0.538	26	5.2	0.00240	1.289
<input type="checkbox"/>	14	<a href="#">BIOENERG RES</a>	1939-1234	236	4.019	4.077	0.568	37	2.3	0.00099	0.982
<input type="checkbox"/>	15	<a href="#">CRIT REV ENV SCI TEC</a>	1064-3389	1511	4.000	7.653	0.600	20	8.7	0.00296	2.118
<input type="checkbox"/>	16	<a href="#">REMOTE SENS ENVIRON</a>	0034-4257	15619	3.954	4.607	0.602	244	7.4	0.03506	1.422
<input type="checkbox"/>	17	<a href="#">ANNU REV ENV RESOUR</a>	1543-5938	973	3.737	8.072	0.385	13	5.3	0.00494	3.070
<input type="checkbox"/>	18	<a href="#">J HAZARD MATER</a>	0304-3894	28060	3.723	3.997	0.571	1638	3.0	0.08923	0.810
<input type="checkbox"/>	19	<a href="#">ENVIRON RES</a>	0013-9351	5481	3.500	3.670	0.558	104	6.5	0.01504	1.143
<input type="checkbox"/>	20	<a href="#">BIOL CONSERV</a>	0006-3207	14745	3.498	4.042	0.702	315	6.4	0.04184	1.319



ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>Journal Citation Reports<sup>®</sup>

2010 JCR Science Edition

## Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)Journals from: **subject categories WATER RESOURCES** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)Sorted by: **Impact Factor** [SORT AGAIN](#)

Journals 1 - 20 (of 76)

Page 1 of 4

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data <sup>i</sup>						Eigenfactor <sup>TM</sup> Metrics <sup>i</sup>	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>TM</sup> Score	Article Influence <sup>TM</sup> Score
<input checked="" type="checkbox"/>	1	<a href="#">WATER RES</a>	0043-1354	34724	4.546	4.966	0.656	546	7.9	0.05965	1.247
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">WATER RESOUR RES</a>	0043-1397	23999	2.737	3.081	0.468	449	>10.0	0.04520	1.133
<input type="checkbox"/>	3	<a href="#">J HYDROL</a>	0022-1694	18635	2.514	3.118	0.448	484	8.1	0.04413	1.037
<input type="checkbox"/>	4	<a href="#">ADV WATER RESOUR</a>	0309-1708	3907	2.477	2.749	0.323	130	6.0	0.01481	1.097
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">HYDROL EARTH SYST SC</a>	1027-5606	2612	2.463	2.967	0.545	187	4.3	0.01147	1.092
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">WATER RESOUR MANAG</a>	0920-4741	1818	2.201	2.526	0.258	233	3.6	0.00469	0.478
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">VADOSE ZONE J</a>	1539-1663	1801	2.133	2.183	0.837	98	4.5	0.00811	0.791
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">J CONTAM HYDROL</a>	0169-7722	3183	2.124	2.213	0.424	66	8.2	0.00742	0.805
<input type="checkbox"/>	9	<a href="#">IRRIGATION SCI</a>	0342-7188	1042	2.113	2.485	0.432	37	7.3	0.00239	0.720
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">HYDROL PROCESS</a>	0885-6087	8914	2.068	2.559	0.548	301	6.7	0.02476	0.851
<input type="checkbox"/>	11	<a href="#">AQUAT CONSERV</a>	1052-7613	1717	1.968	2.272	0.449	89	6.2	0.00414	0.611
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">ENVIRON TOXICOL</a>	1520-4081	1807	1.932	2.164	0.314	70	6.3	0.00420	0.566
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">CATENA</a>	0341-8162	3552	1.893	2.398	0.212	85	7.7	0.00863	0.795
<input type="checkbox"/>	14	<a href="#">DESALINATION</a>	0011-9164	12776	1.851	1.899	0.329	678	5.2	0.02981	0.405
<input type="checkbox"/>	15	<a href="#">RIVER RES APPL</a>	1535-1459	1428	1.822	2.378	0.500	88	4.7	0.00569	0.729
<input type="checkbox"/>	16	<a href="#">NAT HAZARD EARTH SYS</a>	1561-8633	1595	1.792	1.886	0.397	229	3.9	0.00598	0.534
<input type="checkbox"/>	17	<a href="#">AGR WATER MANAGE</a>	0378-3774	4038	1.782	2.391	0.616	279	5.5	0.01031	0.629
<input type="checkbox"/>	18	<a href="#">STOCH ENV RES RISK A</a>	1436-3240	820	1.777	1.700	0.196	97	4.0	0.00283	0.460
<input type="checkbox"/>	19	<a href="#">WATER AIR SOIL POLL</a>	0049-6979	8261	1.765	1.929	0.226	323	9.4	0.01255	0.529
<input type="checkbox"/>	20	<a href="#">INT J SEDIMENT RES</a>	1001-6279	271	1.708		0.139	36	3.2	0.00050	

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)



## 2. CONTRIBUCIÓN DEL DOCTORANDO





José Antonio Castro Hermida, Investigador Titular del Laboratorio de Parasitología del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo perteneciente al Instituto Galego da Calidade Alimentaria de la Xunta de Galicia y M<sup>a</sup> Elvira Ares Mazás, Catedrática de Parasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela, en calidad de Director y Tutora, respectivamente, del trabajo de Tesis Doctoral titulado **“Contribución de los animales domésticos y silvestres a la contaminación de aguas superficiales por *Cryptosporidium* y *Giardia*”**,

#### EXPONEN:

Que D. Ignacio García Presedo, que inició sus estudios de doctorado en el curso académico 2007-2008, ha participado activamente en todas las fases del trabajo experimental y de análisis de los resultados descritos en las seis publicaciones científicas que constituyen la memoria de su Tesis Doctoral. Concretamente, su trabajo se ha centrado en los estudios sobre la contribución de los animales domésticos y silvestres a la contaminación de aguas superficiales por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia duodenalis*. La participación del doctorando se desglosa de la siguiente forma:

- Diseño experimental: numerosas aportaciones en el diseño de todos los estudios epidemiológicos llevados a cabo en este trabajo de Tesis Doctoral.
- Material y Métodos: Recogida, procesado y análisis de muestras fecales y de aguas (superficiales, potables y residuales). Aplicación de técnicas microscópicas clásicas para la identificación y determinación de la viabilidad de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *G. duodenalis*. Realización de técnicas inmunológicas y moleculares para la identificación y caracterización molecular de los aislados obtenidos de las muestras fecales y del agua.
- Resultados: presentación de resultados y estudio estadístico.
- Discusión: participación en la interpretación y discusión de resultados.
- Redacción de las publicaciones: participación en la redacción de los seis artículos que se presentan en este trabajo de Tesis Doctoral, así como en las contestaciones a las objeciones propuestas por los evaluadores y el editor.

En Santiago de Compostela, a 11 de junio de 2012

Fdo. José Antonio Castro Hermida

Fdo. M<sup>a</sup> Elvira Ares Mazás



### **3. DECLARACIÓN DE COFLICTO DE INTERESES DE LOS COAUTORES**







**XUNTA DE GALICIA**  
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL  
Centro de Investigacións Agrarias de Mabegondo



### DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los coautores de los seis trabajos publicados que constituyen el cuerpo de la Tesis Doctoral declaran que no existe ningún conflicto de intereses relacionado con los manuscritos y autorizan la presentación de la Tesis Doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.

1. Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M. 2008. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Water Research*, 42: 3528-3538.
2. Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M. 2008. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water. *Science of the Total Environment*, 405: 45-53.
3. Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M. 2009. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: a health risk for humans and animals. *Water Research*, 43: 4133-4142.
4. Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; González-Warleta, M.; Mezo, M. 2010. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. *Water Research*, 44: 5887-5896.
5. Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; González-Warleta, M.; Mezo, M. 2011. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Galicia (NW, Spain). *Veterinary Parasitology*, 179: 216-219.
6. Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Mezo, M. 2011. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain). *Science of the Total Environment*, 409: 2451-2459.

José Antonio Castro-Hermida

Marta González-Warleta

Mercedes Mezo

Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Instituto Galego da Calidade Alimentaria, Xunta de Galicia (España).

André Almeida

José Manuel Correia da Costa

Centro de Estudos de Ciência Animal, Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares, Universidade do Porto (Portugal).

En Santiago de Compostela a 14 de octubre de 2011

